

Aus dem Zentrum für Innere Medizin der Philipps-Universität Marburg

Geschäftsf. Direktor: Prof. Dr. med. Arnold

Klinik für Innere Medizin

Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und Immunologie

Direktor: Prof. Dr. med. Neubauer

**Radio-Chemoresistenz beim kleinzelligen Bronchialkarzinom-
Möglicher Einfluss AKT-abhängiger Signaltransduktionswege**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von
Ines Ferber aus Eschweiler

Marburg, 2004

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Phillips-Universität Marburg

am 06.05.2004

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. med. Maisch

Referent: Prof. Dr. med. Schuermann

Korreferent: Prof. Dr. med. Behr

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis	3
2. Vorwort	5
3. Theoretische Grundlagen	6
3.1. Ätiologie und Pathogenese von Lungentumoren	6
3.2. Ursprung und Klassifikation des Bronchialkarzinoms	8
3.2.1. Einteilung der Lungentumoren	8
3.2.2. Kleinzelliges Bronchialkarzinom-Small Cell Lung Cancer	10
3.2.3. Nicht- Kleinzellige Bronchialkarzinome - NSCLC	11
3.3. Therapie der Lungentumoren	12
3.4. Apoptose und Tumorentstehung	13
Abbildung 5: Die Apoptosekaskade	13
3.5. Apoptoseregulation durch Proteinphosphorylierung	14
3.5.1. Der PI3-Kinase- PKB (AKT)-Signalweg : Apoptoseschutz für die Zelle	14
3.5.2. Ras initiiert sowohl AKT- als auch MAPK-Signalweg	16
3.5.3. Übersicht der AKT-Funktionen	17
3.5.4. AKT im Mittelpunkt der Apoptosekontrolle	17
3.6. Adhärenzvermittelte AKT-Aktivierung	21
3.6.1. FAK verbindet extrazelluläre Matrix mit AKT-Signalkaskade	21
3.7. Relevanz des PI3K-AKT-Pathways für das kleinzellige Bronchialkarzinom	23
3.8. MAP-Kinasen und Zelldifferenzierung	25
3.8.1. MAP-Kinasen und Tumorigenese	26
3.9. Sekundäre Chemoresistenz beim kleinzelligen Bronchialkarzinom	28
3.9.1. Das Variantenmodell zur Chemoresistenz : Stand der Forschung	28
3.9.2. Theorien zur Chemoresistenz	30
4. Vorarbeiten	32
4.2. Spontane Adhärenz unter <i>in vitro</i>- Bedingungen	33
4.2.1. Entstehung von Varianten	33
4.2.2. Charakterisierung der Varianten	34
4.3. Aufgabenstellung	35
5. Materialien	37
5.1. Chemikalien	37
5.2. Enzyme, Fertigpuffer und Nukleinsäuren	38
5.3. Kits und Antikörper	38
5.5. Lösungen, Puffer und Nährmedien	41
5.6. Gele	43
5.7. Reaktionsgemische	43
5.7.1. cDNA-Synthese	43
5.7.2. RT-PCR	44
5.7.3. Bandshift-Assay	44
5.8. Geräte	44
5.9. Zelllinien	45

6. Methoden	46
6.1. Zellkultur	46
6.1.1. Zellkulturmodell	46
6.1.2. Zellkultur auf unbeschichteten Bakterienkulturschalen	46
6.2. Methoden zur Proteinchemie und Signaltransduktion: Western-Blot	47
6.2.2. Proteinextraktion	48
6.2.3. Proteinkonzentrationsbestimmung nach Lowry	49
6.2.4. Western Blot	50
6.2.5. Immunpräzipitation	51
6.3. Methoden zur Genexpression	53
6.3.1. Reverse-Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	53
6.3.3. RNA-Extraktion mit RNeasy TM B	54
6.3.4. RNA-Quantifizierung und Reinheitskontrolle	55
6.3.5. cDNA-Synthese	56
6.3.6. Eigentliche RT-PCR	56
6.4. Bandshift-Analyse	57
6.4.2. Präparation von Kernextrakten in hochkonzentrierten Salzlösungen	58
6.4.3. Hybridisierung synthetischer Oligonukleotide	59
6.4.4. Markierung der Oligonukleotide	59
6.4.5. Reinigung der markierten Oligonukleotide	60
6.4.6. Gelretardationsanalyse	61
7. Ergebnisse	62
7.1.1. Methodik	62
7.1.2. Spontane Adhärenz korreliert mit Verlust neuronaler Differenzierungsmarker	63
7.1.3. Adhärenz Zellen zeigen Charakteristika undifferenzierter Nichtkleinzeller	64
7.1.4. Adhärenz Klone sind resistenter gegenüber Zytostatika	66
7.1.5. Apoptoseverhalten der adhärenz Zellen bei Bestrahlung	67
7.1.6. AKT-Expression in varianten kleinzelligen Bronchialkarzinomen	69
7.1.7. MAPK-Aktivität in adhärenz Varianten	70
7.2. AKT-gesteuerte Signalwege	72
7.2.1. BAD-Phosphorylierung in adhärenz Klonen	72
7.2.2. Expression der BCL2-Mitglieder	73
7.2.3. NFκB als transkriptioneller Aktivator antiapoptotischer Gene	74
7.2.4. NFκB-Aktivität	76
7.3. Akt-Aktivierung durch Adhärenz	77
7.3.1. Integrinexpression	78
7.4. Morphologische Transdifferenzierung	79
8. Diskussion	81
8.1 Adhärenz Zellen entsprechen varianten Zellen	82
8.2 Erhöhte Chemoresistenz korreliert mit AKT-Aktivität	83
8.3 Wirkungen von AKT	83
8.3.1 NFκB-Aktivität durch AKT	83
8.3.2 AKT inaktiviert BAD	84
8.4 Adhärenzvermittelter Apoptoseschutz	85
8.4.1 Integrinexpression in adhärenz Zelllinien	85
8.4.2 Adhärenz und AKT-Aktivierung	86
8.5 MAPK-Aktivität	87
8.6 Klinische Relevanz	88
9. Zusammenfassung	90
10. Literaturverzeichnis	92

1. Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
ACTH	Adreno-corticotrophes Hormon
ADC	Adenokarzinom
ADH	Antidiuretisches Hormon
BP	Basen Paare
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cpm	counts per minute
cSCLC	classic small cell lung cancer / kleinzelliges Bronchialkarzinom
DNA	Desoxy-Ribonukleidacid
ECM	extracellular matrix
ERK	extracellular regulated kinase
FAK	focal adhesion kinase
GRP	gastrin releasing peptide
GTP	Guanosintriphosphat
Gy	Gray
H69ad	NCI-H69 adhärent
H69sus	NCI-H69 suspension
IAP	inhibitor of apoptosis
kDA	kilo Dalton
LCC	large cell carcinoma / großzelliges Bronchialkarzinom
LRP	lung resistance protein
MAPK	mitogen activated protein kinase
MDR	multidrug resistance
mRNA	messenger Ribonucleidacid
MRP	multidrug resistance protein
nm	nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NSCLC	non small cell lung cancer
NSE	neurone specific enolase
PDGF	platelet derived growth factor

PI3K	Phosphatidylinositol 3-OH-Kinase
PKB	Proteinkinase B / AKT
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion
SCLC	Small cell lung cancer, kleinzelliges Bronchialkarzinom
Ser	Serin
SH2-Domäne	src-Homology2-Domäne
Threo	Threonin
TNF	Tumornekrosefaktor
TNM	Tumor-Nodus-Metastase \Rightarrow WHO-Tumorklassifikation
Tyr	Tyrosin
U	Unit / Einheit für Enzymaktivität
UpM	Umdrehung pro Minute
V	Volt

2. Vorwort

Unter den Lungentumoren zeichnet sich das kleinzellige Bronchialkarzinom durch einen besonders hohen Malignitätsgrad aus. Dieser Tumor spricht charakteristischerweise zunächst gut auf herkömmliche Therapieverfahren wie Zytostatikabehandlung und Bestrahlung an, neigt jedoch mit hoher Wahrscheinlichkeit dazu, nach 6 bis 9 Monaten ein Rezidiv zu entwickeln, das sich als resistent gegen eine Therapiefortsetzung erweist. Die meisten Patienten versterben innerhalb weniger Monate an den Folgen des progredienten Tumorwachstums.

Diese in Nachhinein erworbene Chemoresistenz bzw. Radioresistenz stellt ein ernstes Problem der Onkologie dar, dessen Ursachen noch weitgehend unbekannt sind.

Bei anderen Tumorarten können ebensolche Resistenzphänomene beobachtet und teilweise erklärt werden. Die Mechanismen der Chemoresistenz, auf welche im Kapitel 2.9.2 eingegangen wird, treffen jedoch auf das kleinzellige Bronchialkarzinom nicht zu.

Eine Korrelation zwischen dem Resistenzverhalten der Tumorzellen und einer morphologischen Umdifferenzierung zu „varianten Zellen“, die sich nach der Sektion im Lungentumors nachweisen lassen ist jedoch beschrieben worden [Hirsch et al., 83].

Ein Grund für die bisher unbekannten Mechanismen bei der Resistenzentwicklung liegt darin, dass bislang kein Zellkulturmodell zur Verfügung stand, an dem Untersuchungen zur Signaltransduktion und Genexpression der varianten Zellen durchgeführt werden konnten.

Diese Arbeit ist Teil eines Projekts, das sich die Etablierung eines Zellkulturmodells zur Variantenentstehung beim kleinzelligen Bronchialkarzinom zum Ziel gesetzt hat, um an diesem die Mechanismen der Resistenz zu entschlüsseln.

Die Aufgabenstellung der Arbeit bestand darin, bei den varianten Zellen Signalwege und die Expression bestimmter Gene zu untersuchen, die bekanntermaßen eine Rolle bei der Entstehung von Resistenzphänomenen spielen. Die antiapoptotischen Wirkungen der Proteinkinase B (AKT) stehen im Mittelpunkt der Untersuchungen.

Die beschriebenen Experimente wurden in der Zeit von Juni 1999 bis Dezember 2000 durchgeführt. Die schriftliche Auswertung wurde im Dezember 2002 abgeschlossen. Publiziert wurden die folgenden Daten im Dezember 2002 in „Oncogene“ unter dem Titel “In vitro chemo-and radio-resistance in small cell lung cancer correlates with cell adhesion and constitutive activation of AKT and MAP kinase pathways.“.

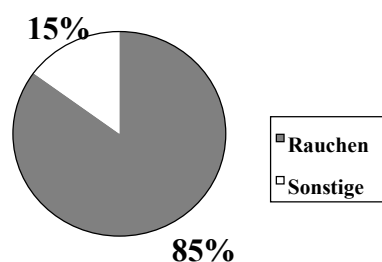
3. Theoretische Grundlagen

3.1. Ätiologie und Pathogenese von Lungentumoren

Unter den Todesursachen durch Krebserkrankungen nehmen Lungentumoren eine führende Position ein. Das Bronchialkarzinom ist der häufigste maligne Tumor beim Mann. Die Erkrankung nahm im letzten Jahrhundert massiv zu, wobei in den Industrienationen zehnfach höhere Inzidenzen zu verzeichnen sind als in anderen Gebieten. Hierbei ist die Wichtigkeit des Nikotinabusus in der Ätiologie dieser Tumorart, insbesondere beim Plattenepithelkarzinom und beim kleinzelligen Bronchialkarzinom (SCLC), zu betonen.

85% aller Bronchialkarzinome werden mit dem Rauchen in Verbindung gebracht. Tabakrauch enthält zahlreiche kanzerogene Stoffe, wie z.B. Benzpyren und Nitrosamine. Dabei steigt das Risiko mit der Zahl der konsumierten Zigaretten, der Dauer des Abusus und durch inhalatives Rauchen. Bei einem Konsum von 10 bis 20 Zigaretten pro Tag erhöht sich das Erkrankungsrisiko etwa um das Zehn- bis Zwanzigfache gegenüber dem des Nichtraucher. Selbst Passivrauchen geht mit dem doppelten Risiko einher. Die Gefährdung lässt sich allerdings durch Nikotinabstinenz auch nach langjähriger Abhängigkeit wieder senken. Nach zehn bis zwanzig Jahren ähnelt das Karzinom-Risiko wieder dem des Nichtrauchers [Baenkler, Klingmüller et al. S.501ff; Thomas, S.138 Abschnitt 10.1.4ff].

Abbildung 1: Ursachen des Bronchialkarzinoms



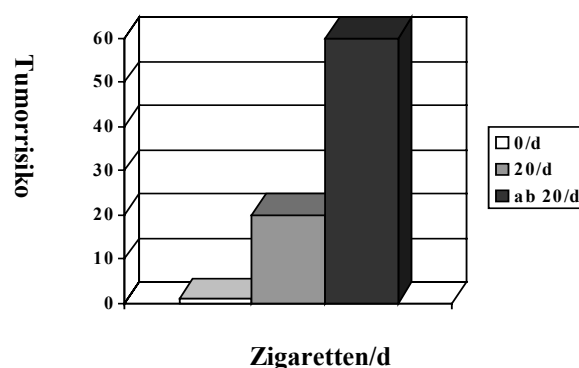
Im Zuge des wachsenden Nikotinkonsums und insbesondere des inhalativen Rauchens bei Frauen im Verlauf der letzten dreißig Jahre hat das Bronchialkarzinom auch beim weiblichen Geschlecht zugenommen. Derzeit machen Bronchialtumoren beim Mann 35%, bei der Frau 30% (im Vergleich zu vorher 8%) aller Todesursachen durch Krebs aus.

Als weitere Faktoren in der Pathogenese von Lungentumoren können ionisierende Strahlung, Asbestexposition und Arsen eine Rolle spielen, wobei das Risiko multiplikativ mit der Zahl der Risikofaktoren steigt.

Da sich der Tumor in der Regel erst einige Jahrzehnte nach der Toxinexposition manifestiert, beträgt das durchschnittliche Erkrankungsalter 65 Jahre. Eine Ausnahme stellt hierbei das Adenokarzinom dar, dessen Durchschnittsmanifestationsalter bei 45 Jahren liegt. Für den Erkrankten fehlt durch das lange Zeitintervall zwischen dem Beginn der Toxinexposition und dem Ausbruch der Krankheit häufig eine direkte Assoziation zwischen seinem Nikotinabusus und dem Krebsrisiko, so dass häufig eine mangelnde Compliance die Prophylaxe dieser Tumorart durch Einstellen des Rauchens beeinträchtigt.

Für alle Formen des Bronchialkarzinoms ist die Heilungsaussicht schlecht: Von 100 Patienten sind zum Diagnosezeitpunkt 2/3 nicht mehr operabel. Nur 5% der Patienten überleben die ersten fünf Jahre [Herold 2002; S. 330, Z.25ff].

Abbildung 2: Zigarrettenkonsum und Tumorrisiko



3.2. Ursprung und Klassifikation des Bronchialkarzinoms

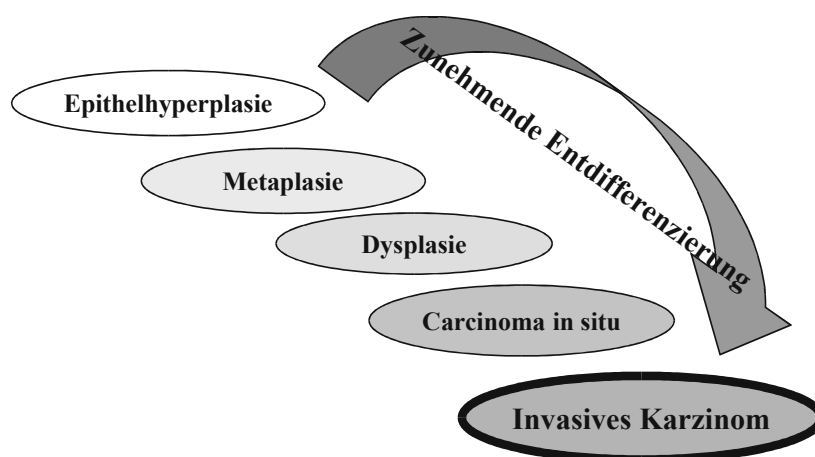
Es wird angenommen, dass Lungentumoren aus pluripotenten Stammzellen epithelialen Ursprungs hervorgehen. Möglicherweise sind dies Clarazellen, TypII Pneumozyten und Reservezellen des bronchioalveolären Epithels.

Bei der Tumorentstehung durchlaufen diese Zellen mehrere prä-maligne Stadien von der Hyperplasie bis zum invasiven Karzinom [Carbone, 97].

Charakteristisch ist eine zunehmende Entdifferenzierung des Zelltyps hin zu polymorphen Zellen, in denen sich atypische Kerne und Mitosen häufen.

Das invasive Karzinom ist gekennzeichnet durch destruierendes Wachstum, Infiltration der Umgebung und Metastasierung.

Abbildung 3: Stadien der Tumorentstehung



3.2.1. Einteilung der Lungentumoren

Von besonderer klinischer Relevanz erweist sich die Einteilung in kleinzellige Bronchialkarzinome (SCLC) und nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome (NSCLC) nach histologischen Kriterien, da sich die beiden Subtypen in Ausbreitungsart und Therapie grundlegend unterscheiden. Bei den NSCLC wird weiter unterteilt in Adenokarzinome, Plattenepithelkarzinome und großzellige undifferenzierte Karzinome [C.Thomas et al. S.140 Z.11-24].

Abbildung 4: Anteilshäufigkeiten der Lungentumoren

[Baenkler, Klingmüller et al. S.501]

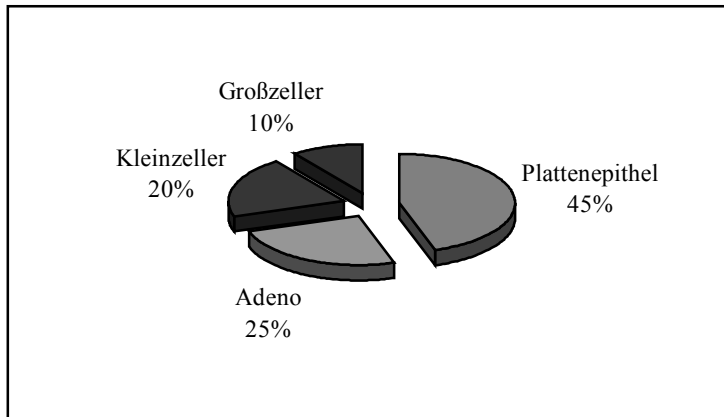


Tabelle 1: Charakterisierung von SCLC und NSCLC

	SCLC	NSCLC
Lokalisation	zentral fingerartige Ausbreitung	meist peripher Rundherde
Unterteilung	klassisch: cSCLC variant: vSCLC Mischtyp	Plattenepithel Adenokarzinom Großzeller (undifferenziert)
Morphologie	lymphozytenartige kleine Zellen	je nach Tumortyp (s.o.)
Metastasierung	sehr früh	später
Biochemie	neuroendokrine Sekretion	
Therapie	Chemo/Radio, meist palliativ	OP
Therapieverhalten	primär chemo-/radiosensibel sekundäre Resistenz	primär resistent

[Baenkler, Klingmüller et al. S.506-512 ; Herold et al., S.326-330]

3.2.2. Kleinzelliges Bronchialkarzinom-Small Cell Lung Cancer

Das kleinzellige Bronchialkarzinom gehört zu den aggressivsten unter den Lungentumoren. Es zeichnet sich durch eine schnelle, fingerartige Ausbreitungsart entlang der Bronchien und durch rasche Fernmetastasierung aus. Der Tumor wächst bevorzugt zentral in Hilusnähe und nimmt rasch an Größe zu. Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose finden sich bei 30% der Patienten Fernmetastasen, bei Obduktionsbefunden sogar in 90% der Fälle [C.Thomas, S.141, Z.16-31].

Die Metastasierung erfolgt, ähnlich wie bei anderen Lungentumoren auch, bevorzugt in Leber (65%), Nebenniere (60%), ZNS, Pankreas und Knochen (je 30%). Auffällig ist eine stark erhöhte Häufigkeit von ZNS-Metastasen von 75% nach vorangegangener Chemotherapie [C.Thomas, S.141, Z.31-37].

Mit einer mittleren Überlebensrate von unbehandelt drei Monaten bei einseitigem Befall ist die Prognose dieses Tumors sehr schlecht. Bei beidseitiger Ausbreitung des Tumors verkürzt sich diese Zeitspanne auf anderthalb Monate [Baenkler, Klingmüller et al. S.507 Z1ff].

Früher erfolgte die Einteilung des SCLC rein histologisch in das Oatcell-Karzinom (Haferzellkarzinom), das sich durch lymphozytenartige, fast nacktkernige Zellen auszeichnet, und den Intermediärtyp, dessen Zellen zytoplasmareicher sind als die des Oatcell-Karzinoms. Untersuchungen haben jedoch ergeben, dass diese Einteilung keinerlei klinische Relevanz [Gazdar, 85] beinhaltet. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass eine Minderheit der kleinzelligen Tumoren eine NSCLC-ähnliche Komponente aufweist, und dass Unterschiede im Therapieverhalten zwischen dem normalen SCLC und diesen Mischtumoren gefunden wurden [Hirsch et al. 83].

Die Erkenntnisse der letzten Zeit deuten stark darauf hin, dass eine neue Einteilung der SCLC in klassische und variante Formen von großer Relevanz für die Therapie des kleinzelligen Bronchialkarzinoms sein könnte. Auf die Eigenschaften dieser varianten Tumoren wird später ausführlicher eingegangen werden, da die damit verbundenen Problematik der Therapieresistenz einen wichtigen Bestandteil dieser Arbeit darstellt.

2.2.2.1. Neuroendokrine Expression

Typisch für das SCLC ist die Expression neuroendokriner Marker. Diese für Zellen neuronalen Ursprungs charakteristischen Stoffe werden von den Tumorzellen produziert und haben häufig eine autokrine mitogene Wirkung, d.h. sie stimulieren das Tumorstadium [Johnson und Kelley, 95]. Insgesamt wurden 14 verschiedene dieser Botenstoffe, darunter quantitativ vorrangig ACTH identifiziert. Als Marker für das SCLC wurden L-Dopa-Decarboxylase [Baylin;80], NSE [Marangos et al., 82] und Bombesin [Moody, 81] festgestellt. Aufgrund des Vorhandenseins dieser neuroendokrinen Marker wird vermutet, dass sich das SCLC aus pulmonalen endokrinen Zellen entwickelt [Carbone 97].

Zwar wird L-Dopa-Decarboxylase *in vivo* von allen Arten von Lungentumoren synthetisiert, jedoch vom SCLC in einer signifikant höheren Menge. In Zellkulturen erwies sich das Enzym als Marker für SCLC, da *in vitro* nur SCLC-Linien diese Substanz exprimierten [Baylin, 80].

3.2.3. Nicht- kleinzellige Bronchialkarzinome - NSCLC

Die NSCLC werden in Plattenepithelkarzinome, Adenokarzinome und undifferenzierte großzellige Karzinome unterteilt. Der Differenzierungsgrades variiert von hoch bis unbestimmbar differenziert [Gazdar 92; Testa und Siegfried 92; Müller 94; Roth 95; Becher 93 und 95; Schuermann 95; Müller et al. 95; Tockman 96; Carbone 97; Wistuba et al. 97].

3.3. Therapie der Lungentumoren

Lungentumoren werden im Allgemeinen spät erkannt. 90% werden in einem Stadium diagnostiziert, in dem bereits regionale Filiae oder Fernmetastasen vorliegen.

Die Therapie eines Lungentumors hängt entscheidend von seiner Zuordnung zur Gruppe der SCLC oder NSCLC ab. Dies begründet sich aus dem unterschiedlichen biologischen Verhalten der Tumoren. Im Gegensatz zur TNM-Klassifikation beschränkt sich beim SCLC unter klinischen Gesichtspunkten die Einteilung auf „limited disease“ und „extensive disease“, also der Beschränkung auf eine im Gegensatz zum Übergreifen auf die andere Thoraxseite.

Seine hohe Wachstumsgeschwindigkeit bedingt die Sensibilität des SCLC gegenüber Chemotherapeutika und Bestrahlung, da Zellen während ihrer Mitosephase besonders empfindlich gegenüber Zytostatika sind.

Durch die frühe Fernmetastasierung ist eine Operation des Tumors meist ohnehin unmöglich. Deshalb werden SCLC primär chemo- und radiotherapeutisch behandelt. Die Therapie des SCLC ist stadienabhängig. Eine Übersicht soll die folgende Tabelle geben.

Tabelle 2: Therapie des kleinzelligen Bronchialkarzinoms

Stadium	Ausdehnung	Therapie
Limited disease	Auf eine Thoraxseite beschränkt	Chemotherapie + Bestrahlung Schädelbestrahlung präventiv
Extensive disease I	Befall der kontralateralen Hiluslymphknoten	Chemotherapie + Bestrahlung Schädelbestrahlung präventiv
Extensive disease II	Befall der kontralateralen Lunge / alle übrigen Stadien	Chemotherapie Schädelbestrahlung palliativ

[Herold, S.329ff.; Baenkler et al. S.513]

Die Behandlung der NSCLC unterscheidet sich grundlegend von dieser Strategie. Diese Tumoren sind resistenter gegen Chemo- und Radiotherapie, weshalb bei M0-Stadium eine Operation anzustreben ist.

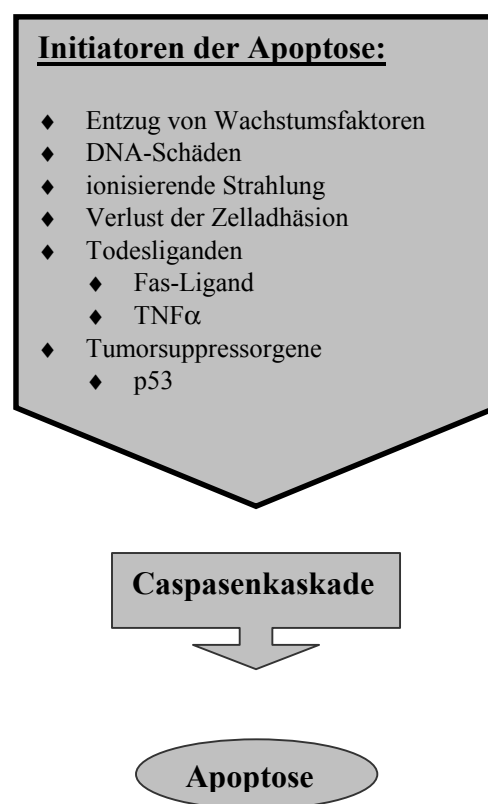
3.4. Apoptose und Tumorentstehung

In einem gesunden Gewebe werden entartete oder defekte Zellen durch ein genau festgelegtes Todesprogramm, die Apoptose, eliminiert.

Diese wird unter anderem beim Entzug von Wachstumsfaktoren, bei DNA-Schäden, die beispielsweise durch Bestrahlung ausgelöst werden können, und bei Verlust der Zelladhäsion (Anoikis) initiiert [Ahmed et al. 97; Dudek 97; Kauffmann-Zeh, Kennedy et al. 97; Khwaja 97; Kulik 97].

Eine Übersicht bietet Abbildung 5.

Abbildung 5: Die Apoptosekaskade



Die Apoptoserate in einem Gewebe wird durch ein Gleichgewicht zwischen fördernden und hemmenden Faktoren geregelt. In vielen Tumoren ist dieses Gleichgewicht gestört, so dass durch überwiegende Apoptosehemmung entartete Zellen nicht eliminiert werden, sondern ungehindert proliferieren können.

Eine entscheidende Bedeutung für die Apoptoseinhibition kommt der Proteinkinase B zu, auch bezeichnet als AKT. Möglicherweise ist dieses Molekül auch für das SCLC von hohem Stellenwert ist und wird deshalb das zentrale Thema dieser Arbeit darstellen.

3.5. Apoptoseregulation durch Proteinphosphorylierung

Für die intrazelluläre Signalweitergabe spielen Proteinkinasen eine wichtige Rolle [Cohen 92; Hunter 95; Pawson 95]. Diese Enzyme vermitteln ihre Wirkung durch Phosphorylierung von Proteinen, die dadurch aktiviert bzw. deaktiviert werden.

Am Anfang solcher Signalwege stehen häufig Membranrezeptoren mit Tyrosinkinaseaktivität [Marshall, 95]. Durch die Bindung eines Mediators an einen Membranrezeptor wird die Signalkaskade in Gang gesetzt. Der Rezeptor dimerisiert und phosphoryliert sich selber, woraufhin weitere Proteine mit SH2-Domänen (src-Homology) phosphoryliert werden.

Wichtige Signalwege, die durch Rezeptortyrosinkinasen initiiert werden können, sind der PI3-Kinaseweg, der MAP-Kinaseweg und der JAK/STAT- Signalweg.

Auch auf die Apoptoseregulation kann durch Proteinphosphorylierung Einfluss genommen werden. In diesem Zusammenhang ist neben dem MAPK-Signalweg eine Kaskade zu beschreiben, die die Proteinkinase B, auch als AKT bezeichnet, einschließt. Auf den in Proliferations- und Differenzierungsprozesse involvierte MAPK-Signalweg wird im Verlauf ebenfalls eingegangen.

3.5.1. Der PI3-Kinase- PKB (AKT)-Signalweg : Apoptoseschutz für die Zelle

Die Proteinkinase B (AKT) ist eine Serin-Threonin-Kinase mit doppelter Spezifität zu ihren Substraten Serin und Threonin. Ihre Aktivierung erfolgt durch Phosphorylierung an Serin 473. Phosphoryliertes AKT vermittelt auf verschiedene Weise antiapoptotischen Schutz beispielsweise bei Entzug von Wachstumsfaktoren, DNA-Schaden und bei Verlust der Zelladhäsion [Datta et al., 97].

In vielen Tumorarten wurde eine Dysregulation dieser Kinase festgestellt, deren Ursache sich entweder durch Überexpression von AKT, konstitutive Aktivierung des Enzyms durch mutierte Ras-Onkogene upstream von AKT oder durch Inaktivität der AKT-inhibierenden Phosphatasen begründen ließ [Khwaja, 99]. Diese Tatsache legt die Vermutung nahe, dass AKT für die maligne Progression von Zellen von Bedeutung sein könnte [Burgering und Coffey, 95].

AKT wurde erstmals als zelluläres Pendant zum viralen Onkogen v-AKT beschrieben [Bellacosa et al. 91; Jones et al. 91; Coffey et al. 92], von dem zwei Formen existieren, nämlich AKT1 und AKT2.

Aufgrund seiner Homologie zu den Proteinkinasen A und C erhielt AKT den Namen Proteinkinase B oder RAC-PK (Related to A and C-Protein Kinase).

Analog der MAPK-Kaskade kann AKT durch Wachstumsfaktoren, wie z.B. EGF, PDGF, Insulin oder bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) aktiviert werden [Burgering and Coffey, 95]. Ein alternativer Weg der Aktivierung über Integrine wird später beschrieben.

Durch Bindung der Wachstumsfaktoren an Rezeptortyrosinkinasen, wird die Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase (PI3K) aktiviert, die über Zwischenstufen AKT aktiviert. Die von den vielen existierenden Isoformen der PI3K am besten charakterisierte besteht aus einer 85kDa großen regulatorischen Untereinheit und einer 110 kDa messenden katalytischen Untereinheit. Ihre Aktivierung erfolgt durch Phosphorylierung der 85kDa-Untereinheit [Datta et al., 97].

Die PI3K generiert PtdIns-3,4,P2 durch Phosphorylierung von Inositoltrisphosphat an D3 [Franke et al., 97]. Dieses vermittelt seine Wirkung auf verschiedene Downstream - Targets mit SH2-Domänen (Src-Homology Domain) oder PH-Domänen (Pleckstrin Homology) von Serin / Threonin- und Tyrosinkinasen [Carpenter and Cantley, 96].

Die Aktivierung von AKT durch PI3K umfasst mehrere Schritte, welche in Tabelle 3 zusammengefasst sind.

Tabelle 3: AKT-Aktivierung

- | |
|--|
| <ol style="list-style-type: none"> 1. Translokation von AKT zur Membran 2. Dimerisierung mit PtdIns-3,4,P2
über PH-Domäne von AKT 3. Phosphorylierung an Thr 308 und Ser 473 |
|--|

[Hemmings et al. 97]

Die Interaktion mit PtdIns-3,4,P2 bewirkt eine Konformationsänderung von AKT und erhöht dessen Fähigkeit, aktiviert zu werden [Franke et al. 97]. Vermutet wird die Aktivierung von AKT durch zwei Kinasen an der Membran, die jedoch bislang noch nicht identifiziert worden sind [Hemmings et al. 97].

Nur die Phosphorylierung an Ser 473 hat Auswirkungen auf die Aktivität der Kinase, da sich diese Stelle im aktiven Zentrum des Enzyms befindet.

3.5.2. Ras initiiert sowohl AKT- als auch MAPK-Signalweg

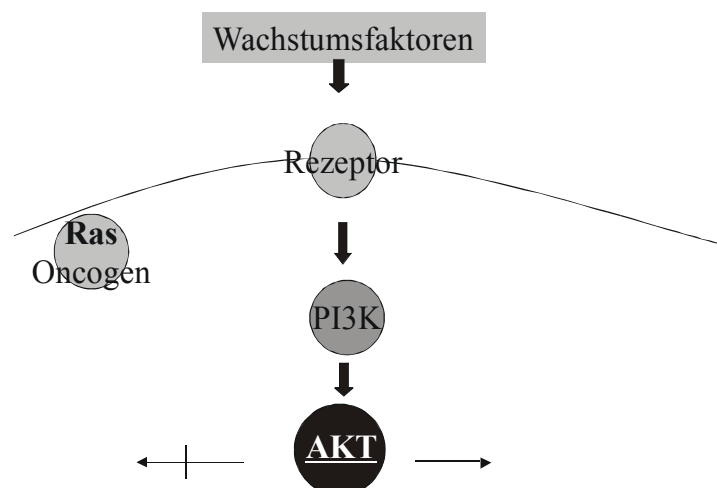
Zwar kann die PI3K direkt über die Phosphorylierung von Rezeptortyrosinkinasen durch Wachstumsfaktoren aktiviert werden, doch besteht, ähnlich wie bei der MAPK-Kaskade ein Umweg über das Onkogen Ras. Ras codiert für Ras-Proteine. Diese sind in den MAPK-Pathway durch Interaktion mit Raf-Proteinen (Ser/Thr-Kinasen) eingebunden, aktivieren jedoch auch die PI3K

[Kodaki et al., 94; Rodriguez-Viciano et al., 94, 96].

Obwohl Ras sich an der PI3K-Aktivierung beteiligt, ist es für diesen Prozess nicht obligat [Klippel et al. 96].

Beweisend für die Stellung der PI3K upstream von PKB ist die Tatsache, dass durch die PI3K-Inhibitoren Wortmannin und LY294002 auch die PKB-Aktivierung zu hemmen ist [Franke et al., 95; Burgering and Coffey, 95; Kohn et al., 95; Cross et al., 95; Andjelcovic et al., 96].

Abbildung 6: AKT-Aktivierung



3.5.3.Übersicht der AKT-Funktionen

Charakteristisch für Signaltransduktionen ist, dass Signalwege sich häufig verzweigen, und oft mehrere Umwege und Schnittstellen zu verschiedenen Auswirkungen führen.

Eine Signalkaskade, die beispielsweise durch Bindung eines Mediators an einen Membranrezeptor angestoßen wird, setzt sich in der Zelle auf unterschiedliche Weise fort.

Entsprechend dieser allgemeinen Eigenschaften von Signalkaskaden sind bei AKT eine Reihe unterschiedlicher Effekte bekannt, von denen bis heute sicherlich nur ein Bruchteil entschlüsselt ist.

AKT beeinflusst beispielsweise die Proteinsynthese, den Kohlenhydratstoffwechsel und moduliert die Transkriptionsfaktoren AP1 und cAMP. Auch eine Funktion für das Wachstum und die Differenzierung neuronaler Zellen konnte von mehreren Gruppen nachgewiesen werden [Deckwerth et al. 96; Deshmukh et al. 96; Dudek et al. 97].

Die meisten der bisher identifizierten Substrate von AKT wirken jedoch am Apoptoseschutz der Zelle mit [Hemmings et al. 97].

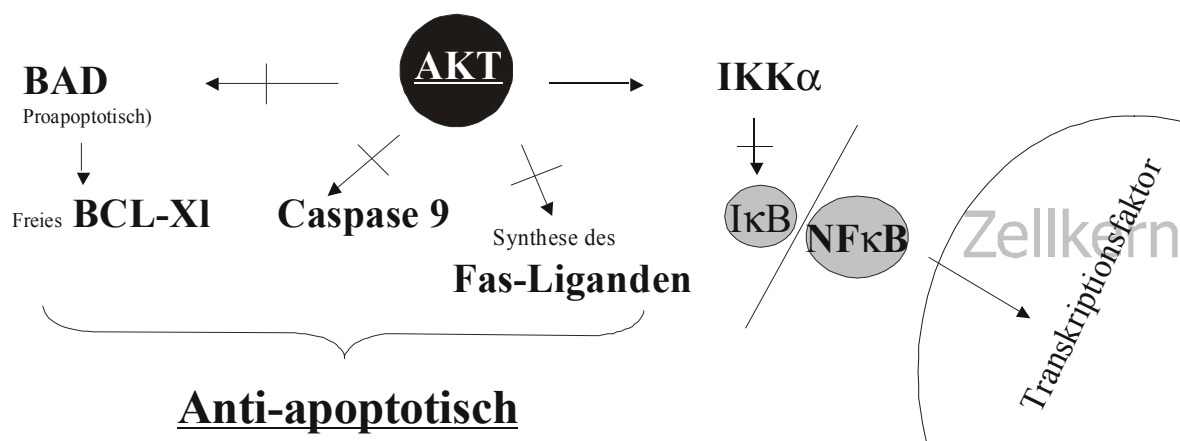
Als erstes Substrat von AKT wurde die Glykogen-Synthase-Kinase3 (GSK3) identifiziert. Sie ist wichtig für die insulinvermittelte Glykogen- und Proteinsynthese und wird durch Phosphorylierung an Serin durch AKT inhibiert [Darren et al. 95]. Dies führt zur Glykogensynthese. Als weiteres Substrat wurde die p70 ribosomale S6-Kinase identifiziert. Für den Apoptoseschutz jedoch sind diese beiden Elemente nicht von Bedeutung [Datta et al. 97].

3.5.4.AKT im Mittelpunkt der Apoptosekontrolle

AKT vermittelt seine antiapoptotischen Wirkungen auf vielerlei Weisen, d.h. unterhalb dieser Kinase gabelt sich der Signalweg. Bisher aufgeklärte Mechanismen werden im Folgenden erläutert.

Tabelle 4: Mechanismen der Apoptosekontrolle durch AKT

1. Inhibition des proapoptotischen Proteins BAD
2. Aktivierung von NFκB
3. Inhibition der Fas-Liganden-Synthese
4. Inhibition der Caspase9
5. weitere Funktionen

Abbildung 7: AKT-Wirkungen

2.5.4.1. Akt inhibiert BAD

BAD ist ein 25kDA großes Mitglied der BCL-2-Familie [Yang et al. 95]. Diese Gruppe von Proteinen zeichnet sich durch ihre Auswirkungen auf die Apoptoseregulation einer Zelle aus. Sie interagieren miteinander durch Dimerisierung und beeinflussen auf diese Weise gegenseitig ihre Wirkung bis zum Überwiegen einer der beiden Gruppen entweder zum Zelltod oder zum Überleben.

BAD gehört zu den proapoptotischen Vertretern und entfaltet seine Wirkung durch Dimerisierung mit den antiapoptotischen Antagonisten BCL-X_L und BCL2. Diese beiden Proteine werden dadurch neutralisiert und es kommt zur Apoptose.

Tabelle 5: BCL2-Proteine

proapoptotisch	BCL-X _s
	BAD
	BAX
	BAK
antiapoptotisch	BCL-2
	BCL-X _L
	MCL-1
	A1
	Bag-1

AKT greift in das Zusammenspiel der BCL2-Familie ein, indem es BAD an Serin 136 phosphoryliert und somit inaktiviert [Datta et al., 97]. BAD löst sich infolgedessen von BCL-X_L und BCL2 und wird selbst an das Phosphoserin-bindende Protein 14-3-3 im Zytosol gebunden [Muslin et al., 96]. Somit erhöht sich der Anteil an freiem BCL-X_L und BCL-2 zugunsten des Überlebens der Zelle [Zha et al., 96].

Durch Phosphorylierung an Ser 136 konnte AKT nach Datta et al. sowohl *in vivo* als auch *in vitro* eine BAD-induzierte Apoptose inhibieren. Eine Phosphorylierung an Ser 112 durch AKT konnte von dieser Arbeitsgruppe nicht nachgewiesen werden. Jedoch wird von anderen Arbeitsgruppen eine Phosphorylierung von BAD sowohl an Ser 112 als auch an Ser 136 in hämatopoetischen Zellen postuliert [Zha et al., 96]. Andere Publikationen bestätigen diese Annahme auch für andere Zelltypen [Gajewski and Thompson, 96; Wang et al., 96].

2.5.4.2. AKT aktiviert NFκB

NFκB ist ein Transkriptionsfaktor, der u.a. die Synthese antiapoptotischer Proteine stimuliert. Darunter sind exemplarisch Survivin (Apoptoseschutz in Tumorzellen), bIAP und cIAP (IAP= Inhibitor of Apoptosis; ubiquitär vorhanden) zu erwähnen. Ein direktes Transkriptionsprodukt von NFκB ist Bfl1, das als Inhibitor von durch TNFα-induzierter Apoptose fungiert [Wie-Xing Zong et al., 99]. Andere Aufgaben erfüllt es in der Immunantwort, bei Stressreaktionen, im Rahmen der T-Zell-Aktivierung und in der Signaltransduktion durch Zytokine [Ozes et al., 99].

Im Zytosol wird NF κ B durch den Inhibitor I κ B gebunden, der seine Kerntranslokation und somit die Interaktion mit der DNA unterbindet. Eine Trennung von I κ B führt zur Aktivierung von NF κ B. Stimuli für diesen Prozess stellen beispielsweise Bestrahlung mit UV-Licht oder die Wirkung verschiedener Zytokine dar.

AKT aktiviert NF κ B, indem es die Kinase IKK α an Threo23 phosphoryliert [Ozes et al., 99], welche infolgedessen seine Wirkung auf I κ B entfalten kann. Durch die Interaktion mit IKK α ändert der Inhibitor I κ B seine Konformation und setzt NF κ B frei. Dieses kann nun im Zellkern seine Wirkung als Transkriptionsfaktor ausüben [Kane et al., 99].

Von Romashkova et al. wurde nachgewiesen, dass die NF κ B-Aktivierung eine Folge der AKT-Stimulation durch PDGF darstellt. Andere Arbeitsgruppen verifizierten eine Beteiligung von AKT an der NF κ B-Aktivierung durch TNF α [Ozes et al., 99]. Bei Hemmung des AKT-Signalweges durch Wortmannin konnte NF κ B nämlich nicht durch TNF α aktiviert werden.

2.5.4.3. weitere Mechanismen des Apoptoseschutz durch AKT

Es wurde festgestellt, dass AKT neben seiner Wirkung auf BAD und NF κ B auch einen direkten Einfluss auf die Apoptosekaskade ausübt, indem es die Pro-Caspase 9 durch Phosphorylierung an Ser 196 hemmt [Cardone et al. 98]. Außerdem verhindert AKT die Synthese des Fas-Liganden, dessen Bindung an den Fas-Rezeptor das Todesprogramm einer Zelle anstößt [Ozes et al., 99]. Inwiefern die kürzlich identifizierte Mithilfe von AKT an der NO-Bildung von Endothelzellen auch eine Auswirkung auf die Apoptoseregulation beinhaltet, wird noch Gegenstand der Forschung sein [Dimmeler et al. 99].

Die Anzahl der Veröffentlichungen in den letzten Jahren lässt vermuten, dass die Thematik der Apoptosekontrolle durch AKT noch lange nicht entschlüsselt ist.

3.6. Adhärenzvermittelte AKT-Aktivierung

Wie schon kurz erwähnt, bedürfen Epithelzellen zum Überleben des Kontakts zur Extrazellulären Matrix (ECM). Durch Wachstumsfaktoren und andere Stoffe des Umgebungsgewebes erhält die Zelle Stimuli, ohne die sie den programmierten Zelltod durchläuft. Der Kontakt zur ECM wird durch Zelladhäsionsmoleküle vermittelt.

Eine Besonderheit von Tumorzellen besteht darin, dass sie in der Lage sind, ohne ECM-Kontakt zu überleben. Seine Ursache findet diese Eigenschaft häufig in einer Umordnung oder veränderten Expression von Zelladhäsionsmolekülen. Darin liegt die Voraussetzung für infiltratives Wachstum und Metastasierung, denn veränderte Adhäsionsmoleküle ermöglichen die Bindung der Zelle an Fremdmatrizes.

Von den Adhäsionsmolekülen sind insbesondere die Integrine zu erwähnen. Sie bestehen aus je einer α - und einer β -Untereinheit, die zum $\alpha\beta$ -Integrin über nicht-kovalente Bindungen assoziieren. Ihre Aktivierung erfolgt durch Konformationsänderung. Bis heute sind 22 Kombinationen verschiedener α - und β -Integrine bekannt. Jede Untereinheit besitzt eine extrazelluläre, eine hydrophobe transmembranöse und eine zytosolische Domäne. Insofern stellen die Integrine ein Bindeglied der Signalweitergabe von der ECM ins Zellinnere dar.

3.6.1. FAK verbindet extrazelluläre Matrix mit AKT-Signalkaskade

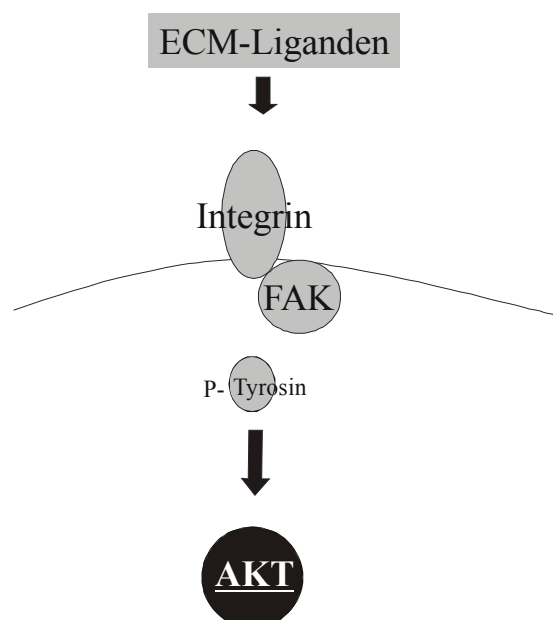
An der Signaltransduktion durch Integrine ist die FAK-Kinase (Focal Adhesion Kinase) beteiligt. Dieses an der Membraninnenseite lokalisierte Enzym assoziiert mit dem Integrin und stellt somit ein Bindeglied zwischen Zytoskelett und Signaltransduktion dar. Im Experiment wurde nachgewiesen dass konstitutiv aktivierte FAK das Überleben von Epithelzellen ohne ECM-Kontakt durch Aktivierung der PI3-Kinase-AKT-Kaskade gewährleistet [Hungerford et al., 96]. Sonoda et al. konnten 1999 in Glioblastomzellen eine Phosphorylierung von FAK und AKT durch Hydrogen-Peroxid erzielen. Gleichzeitig fiel eine Veränderung von Proteinen der BCL2 -Familie downstream von AKT zugunsten eines antiapoptotischen Gesamtergebnisses auf, womit bewiesen war, dass FAK eine Stellung oberhalb von AKT im PI3K-AKT-Pathway einnimmt.

Von den Integrinen erfolgt eine Signalweitergabe durch Autophosphorylierung und somit Aktivierung von FAK u.a. in Position 397. Diese Stelle assoziiert mit der 85kDa-Untereinheit der PI3-Kinase und regt diese zur AKT-Phosphorylierung an [Moore et al., 98]. Parallel zur direkten Aktivierung von PI3-Kinase durch FAK besteht auch ein Umweg über RAS. Beweisend hierfür ist die Tatsache, dass Epithelzellen gegen Anoikis geschützt sind, wenn sie das Ras-Onkogen überexprimieren [Frisch et al., 94]. Somit stellt FAK eine Verbindung der Integrine zum PI3-Kinase-AKT-Signalweg her und ist am Apoptoseschutz der Zelle beteiligt.

Derartige Schutzmechanismen sind für die Tumorzelle essentiell, um ohne ECM überleben zu können und wurden in vielen Tumoren und in Experimenten bestätigt. Eine FAK-Überexpression findet sich z.B. beim kolorektalen oder beim Mammakarzinom [Owens et al., 95]. Konstitutiv aktive Formen der PI3-Kinase oder von AKT sind in anderen Tumorarten identifiziert worden. So findet sich eine AKT-Überexpression in 12% der Ovarialkarzinome, in 3% der Mammakarzinome und in 10% aller Pankreaskarzinome. Die Korrelation mit besonders einer besonders schlechten Prognose der Erkrankung gilt als gesichert [Cheng et al., 96; Bellacosa et al., 95].

Eine Relevanz der Integrin-vermittelten PI3K-Aktivierung für die Zell-Migration und Karzinominvasion werden von anderen Arbeitsgruppen vermutet [Shaw et al., 97; Kelly et al., 97].

Abbildung 8: AKT-Aktivierung durch Integrine



3.7.Relevanz des PI3K-AKT-Pathways für das kleinzellige Bronchialkarzinom

Auch für das SCLC existieren Hinweise, dass der PI3K-PKB-Pathway Funktionen im Apoptoseschutz übernimmt. So wiesen Tallet et al. 1996 nach, dass Tyrosinkinase für das Überleben von SCLC von Bedeutung sind und das wichtigste mitogene Signal in diesem Zelltyp vermitteln. Ein direkter Bezug auf den PI3K-AKT-Pathway wurde jedoch nicht hergestellt. Moore et al. untersuchten 5 SCLC-Zelllinien bezüglich ihrer basalen PI3K- und PKB-Level und fanden diese bei allen Linien erhöht. Durch Inhibition der PI3K konnte die Proliferation der Zellen gehemmt werden. Außerdem verloren sie ihre Fähigkeit, in semisolidem Agarosemedium Kolonien zu bilden. Diese Eigenschaft von Tumorzellen wird als Fähigkeit interpretiert, ohne ECM-Kontakt zu wachsen und sich an Fremdmatrizes anzugleichen. Offenbar ist der PI3K-AKT-Pathway wichtig für diese Fähigkeit beim SCLC.

Für die Aktivierung des Signalwegs durch Integrine spricht außerdem, dass SCLC-Zellen selbst beim Entzug von Wachstumsfaktoren ihre Proliferationsaktivität nicht einstellen, und die basalen PI3K-Level auch unter serumfreien Bedingungen erhöht bleiben [Moore et al., 98]. Bei Inhibition der PI3K jedoch werden die Zellen apoptotisch. Diese Tatsachen legen nahe, dass beim kleinzelligen Bronchialkarzinom, Wachstumsfaktoren nicht den einzigen Weg der AKT-Aktivierung darstellen, sondern die PKB alternativ über den Integrinweg aktiviert werden kann.

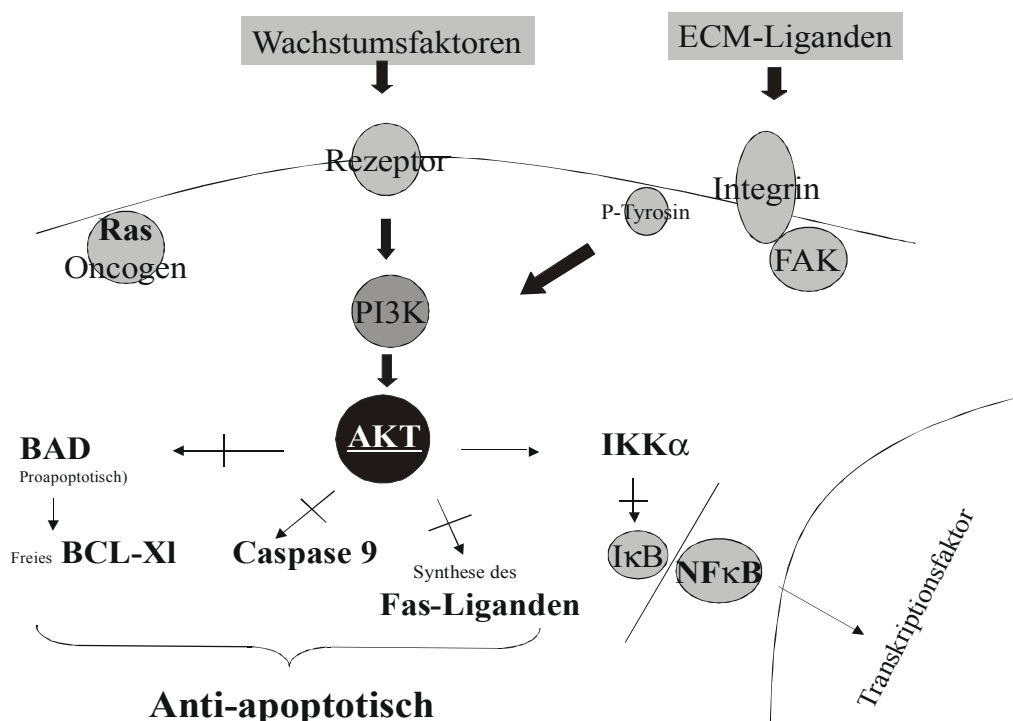
Interessant ist, dass Moore et al. u.a. auch die SCLC-Linie H69 untersuchten, die ebenfalls Gegenstand der in dieser Arbeit beschriebenen Forschungen war. Auch bei dieser Linie fanden sich erhöhte PI3K-Level unter Serumentzug.

Einen Hinweis auf die Involvierung von Integrinen in die AKT-Aktivierung beim SCLC ergab sich durch die Arbeit von Sethi et al. 1999. Diese Arbeitsgruppe untersuchte klassische SCLC-Zellen *in vitro* und *in vivo* auf ihre Integrinexpression und auf Bestandteile der ECM, wie Fibronectin, Kollagen IV und Laminin im Tumorstroma. Dabei wurde festgestellt, dass alle untersuchten Zelllinien (auch hier wieder H69) das Integrin $\beta 1$ stark exprimieren, und dass SCLC *in vivo* in einer ECM-reichen Umgebung wachsen.

In vitro wurde eine ECM durch beschichtete Kulturschalen simuliert, an die sich die Zellen unter Zugabe von Mn^{2+} anhefteten und ein neuronales Aussehen annahmen. Auf die Expression der typischen neuroendokrinen Marker nahm die Morphologieänderung der Zellen keinen Einfluss. Interessanterweise konnte die Adhäsion der Zellen und ihre Gestaltänderung durch Integrin β 1-blockierende Antikörper unterbunden werden. Diese Tatsache beweist, dass der ECM-Kontakt von SCLC-Zellen u.a. durch Integrin β 1 vermittelt wird.

Ein ECM-Kontakt schützt die Zellen vor chemoinduzierter Apoptose, wie Versuche mit verschiedenen Zytostatika bewiesen. Hierbei zeigten sich die an Fibronectin adhärenen Zellen wesentlich resistenter als die Suspensionszellen. Diese Resistenz jedoch konnte bei unspezifischer Adhäsion der Zellen an L-Lysin nicht beobachtet werden. Die Resistenz ließ sich durch Integrin-blockierende Antikörper aufheben.

Vermittelt wird die Resistenz vermutlich über eine Tyrosinkinase Aktivierung, denn die Behandlung mit Tyrophenin bewirkt ebenfalls Verlust des Apoptoseschutzes in den Zellen.



3.8. MAP-Kinasen und Zelldifferenzierung

Eine häufig beschriebene und sehr vielseitige Signalkaskade stellt der MAPK-Signalweg dar (MAPK= Mitogen Activated Proteine Kinase), der durch Wachstumsfaktoren stimuliert wird und in der Zelle u.a. zu Differenzierungsvorgängen und Proliferation führen kann [Hemmings et al., 97].

Es existieren viele Arten von MAP-Kinasen, denen jedoch einige Charakteristika gemeinsam sind. So geschieht ihre Aktivierung immer durch drei aufeinander folgende Proteinkinasen, die sich gegenseitig phosphorylieren und somit aktivieren:

Aktiviert durch eine Rezeptortyrosinkinase wird eine MAPKKK (MAP Kinase Kinase Kinase). Diese Serin/Threonin-Kinase phosphoryliert als nächstes die MAPKK (MAP Kinase Kinase). Ein Charakteristikum dieses Enzyms ist seine doppelte Spezifität gegenüber seiner Substrate Tyrosin und Threonin und bezüglich seiner zwei Serin-Phosphorylierungsstellen. Die MAPKK aktiviert die eigentliche MAPK, welche dann als Serin/Threoninkinase wiederum andere Substrate phosphoryliert.

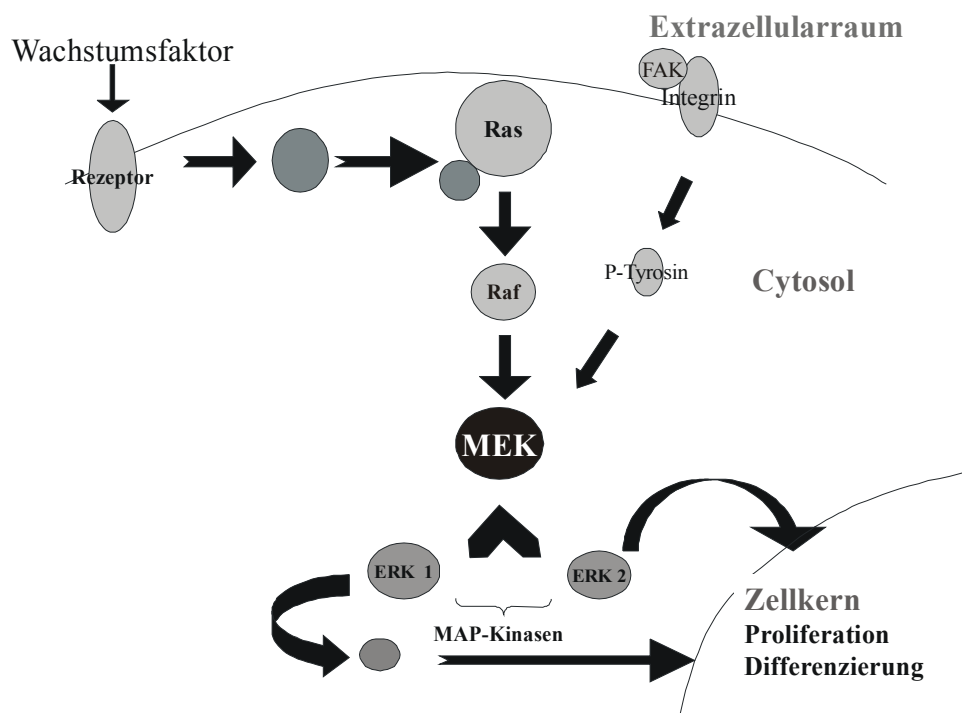
Die zuerst identifizierten MAP-Kinasen stellen die ERKs 1 ($p44^{\text{MAPK}}$), 2 ($p42^{\text{MAPK}}$) dar (ERK= Extracellular regulated kinase)[Ray and Sturgill, 87]. ERKs werden durch den beschriebenen typischen MAPK-Signalweg aktiviert initiiert von Ras. Zunächst wird eine Rezeptortyrosinkinase, z.B. der EGF-Rezeptor, durch Ligandenbindung aktiviert, welche das Onkogenprodukt Ras zu seiner GTP-Form umwandelt. Ras aktiviert Raf-1, eine Serin-Threoninkinase, durch Membranrekrutierung und Phosphorylierung [Leevers et al., 94; Stokoe et al., 94].

Raf-1 wiederum aktiviert MEK, eine Kinase mit doppelter Spezifität, an zwei Serinen, welche dann letztendlich die ERKs an Thr 183 und Tyr 185 phosphoryliert.

Diese Kinasen üben nun ihre Funktion entweder im Zytoplasma oder nach Kerntranslokation im Nucleus aus, wovon auch ihre jeweilige Wirkung abhängt [Marshall et al. 95; Traverse et al. 92,94; Nguyen et al. 93; Didik et al. 94].

Neben dem beschriebenen Ras-Raf-MEK-ERK-Pathway vermuten manche Autoren auch eine Ras-unabhängige MAPK-Aktivierung [Burgering et al. 93; Howe et al. 92]. Hauptsächlich üben die MAP-Kinasen Einfluss auf Proliferations- und Differenzierungsvorgänge in Zellen aus [Seeger et al.]. Dies geschieht durch Modulation von Gen- und Proteinexpression.

Abbildung 10 : MAPK-Signalweg



3.8.1. MAP-Kinasen und Tumorigenese

Für eine Reihe von Tumorarten konnte ein Zusammenhang zwischen der MAPK-Aktivität und dem Tumorwachstum bestätigt werden.

Im Experiment führte konstitutiv aktivierte MAPK zu einem unregelmäßigen Wachstum von Fibroblasten und zur Tumorbildung dieser Zellen in Mäusen [Cowley, 94; Mansour, 94]. Damit erhebt sich der Verdacht einer Funktion der MAPK für die Transformation von Zellen.

In der Tat finden sich in vielen Tumoren hohe Level an aktivierter MAPK. Hoshino et al. fanden in 36% von 138 Tumor-Zelllinien erhöhte MAPK-Level, darunter vor allem in Tumoren von Pankreas, Lunge, Kolon, Ovar und Niere. Auch in histologischen Schnitten solcher Tumoren konnten hohe Aktivitäten der MAPK identifiziert werden. Diese waren häufig vergesellschaftet mit Ras-Mutationen oder Raf-1-Überexpression. Obligatorisch war eine Überexpression der MEK. Hier wird deutlich, dass der gesamte Signalweg Einfluss nimmt auf die maligne Transformation von Zellen vieler Tumorarten.

In Zellkulturexperimenten wurde beobachtet, dass Kolonkarzinom-Zellen hohe MAPK-Level aufweisen. Bei Blockade des MAPK-Signalwegs durch den MEK-Inhibitor PD184352 änderte sich die Morphologie der Zellen zu einer epithelartigen Form. [Sebolt-Leopold et al., 99].

PD184352 bewirkt einen Block in der G1-Phase des Zellzyklus, da die MAPK verantwortlich zum Überwinden dieses Punktes in Kolonkarzinomzellen ist.

Ähnliche Beobachtungen wurden von Qun Lu et al. gemacht. Bei üblicherweise in Aggregaten wachsenden PC12-Zellen löste die Inhibition des MAPK-Signalwegs das Auflösen der Zellkontakte aus, und die Zellen änderten ihre Form hin zu einer epithelartigen Morphologie.

Gleichzeitig wurde eine Veränderung der Expression von Adhäsionsmolekülen festgestellt. Die E-Cadherin/Catenin-Expression nahm ab, wogegen eine Auswirkung auf die Integrine nicht bestätigt werden konnte. Der E-Cadherin/Catenin-Komplex ist verantwortlich für den interzellulären Kontakt im Zellverband, wogegen durch Integrine der Kontakt zum Substrat, bzw. zur Extrazellulären Matrix vermittelt wird.

Ein Verlust der E-Cadherin-Expression in Tumoren wird im Verlauf mit einer schlechten Prognose und verstärkter Infiltrations- und Metastasierungspotenz assoziiert. Aus den Experimenten wurde gefolgert, dass MAPK-Expression zur Depression von E-Cadherin/Catenin führt und somit das Wachstum der Zellen ohne interzelluläre Kontakte adhärent zum Substrat ermöglicht. Dies wiederum gilt als Voraussetzung für die Infiltration und Metastasierung von Tumoren.

In Tierexperimenten mit Kolonkarzinomzellen ging durch Inhibition der MAPK mit PD184352 die Tumorgroße zurück. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass diese Substanz auf die Mäuse keinerlei Nebenwirkungen ausübte. Auf die Metastasierungsrate der Tumoren hatte PD184352 jedoch keinen Einfluss, was andeutet, dass der MAPK-Signalweg in der Metastasierung von Kolonkarzinomen keine Rolle spielt. Auch von anderen Autoren wurde bestätigt, dass die MAPK ohne Bedeutung für die Integrin-vermittelte Infiltration von Tumoren ist [Herrera et al., 98; Klemke et al., 97].

Der Einsatz von PD184352 bei Leukämiezellen blieb erfolglos, offenbar da Leukämiezellen im Gegensatz zu Kolontumoren niedrige Level an aktiver MAPK

aufweisen. Eine Wirkung der MAPK auf die Tumorangiogenese wurde ebenfalls beschrieben [Eliceiri et al., 98].

Wie so oft ist auch hier keine verallgemeinernde Aussage möglich, jedoch gibt es zahlreiche Hinweise, dass die MAPK relevant für die Entstehung und Progression vieler Tumorarten ist.

3.9.Sekundäre Chemoresistenz beim kleinzelligen Bronchialkarzinom

Obgleich eine Chemotherapie beim SCLC in aller Regel zunächst eine Verkleinerung des Tumors bewirkt, entwickeln sich in den meisten Fällen 3 bis 12 Monate nach Abschluss der Therapie ein Rezidiv. Als Komplikation ergibt sich, dass das Tumorrezidiv in aller Regel eine Resistenz gegen Chemotherapeutika aufweist. Diese Therapieresistenz korreliert mit dem Nachweis varianter Zellanteile mit NSCLC-Eigenschaften im Autopsiegut. Einhergehend mit dem Nachweis eines solchen Mischtumors fanden sich bei den betroffenen Patienten ebenfalls kürzere mittlere Überlebenszeiten (6 Monate) als bei Patienten mit reinen SCLC (10.5 Monate) [Radice et al., 82].

3.9.1.Das Variantenmodell zur Chemoresistenz : Stand der Forschung

Für die varianten Zellen ist eine veränderte Morphologie entsprechend NSCLC-ähnlichen Zellen, der Verlust ihrer typischen neuroendokrinen SCLC-Marker und eine Resistenz gegen Chemotherapie und Bestrahlung charakteristisch [Goodwin et al., 82; Gazdar et al., 85]. Diese Resistenz manifestiert sich in der Zellkultur durch eine Hemmung der durch Zytostatika-induzierbaren Apoptose in vSCLC-Linien [Shtivelman, 97].

Schon 1982 entdeckte Baldwin bei der etablierten SCLC-Zelllinie OH-1 eine spontane Änderung ihrer Morphologie, die mit dem Verlust der neuroendokrinen Marker und 100fach höherer Bestrahlungsresistenz einherging. Sozusagen könnte dies ein *in-vitro*-Korrelat zu den resistenten varianten Tumorzellen darstellen. Offenbar handelt es sich bei der Entstehung von Varianten um ein spontanes Ereignis.

Manche Autoren machen hierfür eine Amplifikation des Onkogens c-myc verantwortlich, da diese genetische Veränderung variante SCLC (im Folgenden vSCLC) von klassischen SCLC, in denen das Onkogen nicht vervielfältigt vorkommt, unterscheidet [Little et al. 83]. Die vom Onkogen c-myc codierten Myc-Proteine sind DNA-bindende Proteine, die an der Wachstumsregulation mitwirken [B.Lewin, S.693].

Dass die vSCLC einen besonders malignen Phänotyp des SCLC darstellen, zeigt neben der beschriebenen Therapieresistenz auch ihr gegenüber klassischen SCLC (im Folgendes cSCLC) erhöhten Metastasierungspotential in SCID-hu-L-Mäusen [Shtivelman und Namikawa, 95] .

Shtivelman et al. vermuteten, dass ein möglicher Grund für das erhöhte Metastasierungspotential der vSCLC in ihrem Mangel an CC3-Expression liegen könnte. CC3 findet sich als Metastasierungs-Suppressor in cSCLC und fehlt in vSCLC. Bei Transfektion von CC3 in hochmetastasierende und außerdem chemoresistente vSCLC H82-Zellen verringerte sich ihre Metastasierungspotenz im Tierexperiment und die Resistenz der Zellen. Außerdem wurden die transfizierten Zellen apoptotisch unter Serumdeprivation.

Möglicherweise wird die Änderung in einen resistenten varianten Phänotyp durch die Vorbehandlung der Tumoren getriggert. Variante Zelltypen fanden sich nämlich bevorzugt bei bereits vorthapierten Patienten [Carney et al. 83] und in Autopsiebefunden von Patienten mit erfolglos therapiertem Lungenkarzinom [Fushimi et al., 96]. Bei einer retrospektiven Studie an 25 Patienten mit SCLC wurde in Biopsien eine Änderung zum varianten Typ vorwiegend bei therapieresistenten Tumoren vorgefunden [Kasimis et al., 86].

Unklar bei all diesen Aussagen blieb immer der Mechanismus dieser Differenzierung. Ein Grund dafür mag in dem Mangel an einem funktionierenden Zellkulturmodell für die Variantenentstehung liegen, an dem zellbiologisch der Fragestellung nach den Ursachen für sekundäre Chemoresistenz auf den Grund gegangen werden kann. Mit der Beobachtung von Goodwin et al. der spontanen Variantenentstehung *in vitro* war der erste Ansatz für ein Zellkulturmodell gegeben. Die Identifizierung der zellbiologischen Mechanismen blieb jedoch aus.

3.9.2.Theorien zur Chemoresistenz

2.9.2.1.induzierbare Multidrugresistenz

Das bisher beste Modell für sekundäre Chemoresistenz basiert auf dem Konzept induzierbarer Multiresistenz gegenüber Zytostatika (engl. multi-drug resistance; MDR) und lässt sich *in vitro* durch langfristige Behandlung von SCLC-Zellen über 50 bis 100 Passagen mit Chemotherapeutika nachstellen. Dem Modell zugrunde liegt eine induzierbare Überexpression des P-Glycoproteins (P-gp) oder verwandter transmembraner Pumpenproteine (MRP, LRP) [Scheffer et al., 95], die für einen verstärkten Efflux der Zytostatika aus der Zelle sorgen [Baldwin et al., 97].

Für das P-Glycoprotein konnte der MDR1-Genlocus identifiziert werden. Die Publikationen über MDR1-Genexpression im kleinzelligen Bronchialkarzinom differieren in ihren Aussagen. So fanden einige Autoren nur geringe Expressionen [Lai et al., 89], andere dagegen erhöhte Level an MDR [Abe et al., 96]. Infolgedessen erweist sich die Involvierung des MDR-Konzepts für das SCLC als fraglich. Ebenfalls zweifelhaft ist die Übertragbarkeit dieses Modells auf *in vivo*-Bedingungen, da die kumulative Dosis der *in vitro* verabreichten Chemotherapeutika weit über der in der Klinik nur kurzfristig erreichbaren Gewebekonzentration liegt.

Dennoch existiert das Phänomen der induzierbaren Resistenz gegen Zytostatika beim SCLC, wobei die Mechanismen bislang nicht eindeutig erklärbar sind.

Beispielsweise führt die Behandlung von chemosensitiven Lu-24 SCLC-Zellen, die negativ für das P-Glycoprotein (P-gp) sind, mit Vincristin zu einer Expression der *mdr1* Gens und Bildung von p-gp [Abe et al., 96]. Außerdem entwickelte sich eine Kreuzresistenz der Zellen gegen Vincristin und Doxorubicin, was einer Multidrugresistenz entspricht.

Andere Arbeitsgruppen allerdings fanden keine Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf Doxorubicin-resistente H592 SCLC-Zellen [Supino et al., 93]. Zwar ließ sich hier eine resistente Zelllinie durch Langzeitexposition mit Doxorubicin etablieren, diese zeigte jedoch keine MDR1-Expression. Die Vermutung eines anderen Mechanismus für die Chemoresistenz liegt nahe.

Darüberhinaus ergab eine Studie, in der SCLC-Tumorgewebe auf MDR1 mRNA und P-gp Expression untersucht wurde, dass selbst nach vorangegangener Chemotherapie P-gp nur in einer Minderheit von SCLC-Tumoren exprimiert wird [Savaraj et al., 97].

Widersprüchlich sind auch die Ergebnisse zum Nachweis des Lung resistance proteins (LRP) und des Multidrug-associated proteins (MRP) in resistenten SCLC-Zelllinien. Obwohl eine Studie die Expression von MRP mRNA in über 70% aller SCLC-Tumoren zeigte, fand sich keine Korrelation im Hinblick auf vorangegangene Polychemotherapie [Canitrot et al., 98]. Auch die Expression von LRP ist in SCLC-Tumorgewebe eher niedrig und zeigt keinen Zusammenhang zur klinischen Antwort auf Chemotherapie [Dingemans et al., 96].

Aus diesen Ergebnissen lässt sich der vorläufige Schluss ziehen, dass bei SCLC klassische Mechanismen der Multidrug-Resistenz zwar eine potentielle Rolle bei der Entwicklung sekundärer Chemoresistenz spielen können, diese aber den wesentlichen Teil beobachteter Resistenz nicht erklären.

2.9.2.2. Integrinvermittelte Chemoresistenz im kleinzelligen Bronchialkarzinom

Von Sethi et al. wurde ein Resistenzphänomen in SCLC-Zellen beschrieben, das offenbar durch integrinvermittelten Kontakt an ECM-Bestandteile zustande kommt und zu einer erhöhten Resistenz gegen Etoposid und Doxorubicin führt. Der Mechanismus dieser Resistenz lässt sich erklären durch einen Tyrosinkinasen-abhängigen Apoptoseschutz der Zellen. Wahrscheinlich ist eine durch Integrine vermittelte Aktivierung der Proteinkinasen, denn der Apoptoseschutz ließ sich fast vollständig aufheben bei Einsatz eines gegen Integrin β 1- gerichteten Antikörpers. Offenbar spielt das β 1-Integrin eine tragende Rolle bei der Transduktion des anti-apoptotischen Signals [Sethi et al., 99].

Durch Behandlung mit Tyrophostin, einem Tyrosinkinasen-Inhibitor, ließ sich ebenfalls ein Verlust des Apoptoseschutzes induzieren, was einen Hinweis liefert, dass der PI3K-AKT-Pathway wichtig für die Weitergabe des antiapoptotischen Signals sein könnte.

Weiterhin konnte *in vivo* gezeigt werden, dass SCLC-Tumoren reichlich Integrin- β 1 exprimieren und dass eine starke Immunoreaktivität für ECM-Proteine wie Fibronectin und Kollagen 4 im Stroma besteht. Von 16 Patienten mit SCLC zeigten diejenigen mit Fibronectin-reichem Tumorstroma signifikant kürzere Überlebenszeiten (8.4 +/- 1.7 gegenüber 15 +/- 2.6 Monate) [Sethi et al., 99].

Diese Ergebnisse sind von besonderem Interesse, weil zum ersten Mal ein Zusammenhang zwischen Chemoresistenz und Zelladhärenz bei SCLC-Tumoren

beschrieben wurde. Unterstrichen wird auch die mögliche Rolle von Proteintyrosin-Kinase Signalwegen in der Entwicklung von Chemoresistenz bei SCLC-Tumoren. Da konstitutive Aktivierung der PI3-Kinase in SCLC-Zelllinien gefunden wurde [Moore et al., 98], könnte insbesondere der PI3 Kinaseweg, der über Aktivierung der Proteinkinase AKT zur Hemmung von Apoptose führt, von großer Bedeutung sein.

4.Vorarbeiten

Seit längerer Zeit beschäftigt sich die Arbeitsgruppe mit der Etablierung eines Zellkulturmodells zur Variantenentstehung, um an diesem die Vorgänge bei der Entstehung sekundärer Resistenz entschlüsseln zu können. Das Phänomen der spontanen Adhärenz, wie es schon von anderen Arbeitsgruppen beschrieben worden ist, konnte in der Zellkultur der klassischen Kleinzellerlinie NCI-H69 ebenfalls beobachtet werden. Auf diesen Erkenntnissen aufbauend wurden die adhärenenten Zellen auf ihre Eigenschaften untersucht, insbesondere auf das Vorhandensein von Variantenmerkmalen wie dem Verlust der neuroendokrinen Marker und einer erhöhten Resistenz der Zellen.

Hier soll nun zunächst eine Beschreibung von Bronchialtumorzellen in Kultur vorgenommen werden, um das beobachtete Phänomen für den Leser transparenter zu gestalten.

Anschließend wird auf das Projekt, in welches diese Arbeit eingebunden ist, ausführlicher eingegangen.

4.2. Spontane Adhärenz unter *in vitro*- Bedingungen

4.2.1. Entstehung von Varianten

In Zellkultur wachsen klassische SCLC-Zelllinien typischerweise in Suspension in dicht gepackten Aggregaten bis zu mehreren hundert Zellen. Die Einzelzellen sind klein und rund bis eiförmig. Charakteristisch ist eine lange Populationsverdopplungszeit von 79-97h. Ihre Neigung zur Koloniebildung in Softagar ist als eher gering beschrieben worden [Gazdar et al., 85]. Diese Eigenschaft von Kulturzellen wird interpretiert als ein mögliches Korrelat zur Metastasierungspotenz. Für alle klassischen Kleinzeller ist charakteristisch, dass sie neuroendokrine Marker wie z.B. L-Dopa-Decarboxylase exprimieren.

Sogenannte variante Kleinzeller unterscheiden sich in ihrer Morphologie und in ihren biochemischen Eigenschaften von klassischen Kleinzellern. Die von Gazdar et al. aus varianten Tumoren kultivierten Zellen beispielsweise hatten Ähnlichkeit mit NSCLC-Zellen und wuchsen nicht in Ballen zu mehreren hundert Zellen, sondern in kleinen Aggregaten oder als Einzelzellen in Suspension. Unter diesen findet sich auch die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Zelllinie NCI-H82. Außerdem teilen sie sich schneller (Populationsverdopplungszeit 32h) und neigen zu Koloniebildung in Softagar. Typischerweise verlieren sie ihre neuroendokrinen Marker.

Als Ergänzung ist anzumerken, dass NSCLC-Zellen im Gegensatz dazu *in vitro* typischerweise adhärent wachsen, d.h. epithelartig auf beschichteten Kulturflaschen.

Werden SCLC-Zellen über längere Zeit kultiviert, so neigt eine Minderheit der Zellen zu dem Phänomen der spontanen Adhärenz. Die Zellen lösen sich aus dem Verband und nehmen Kontakt mit dem Flaschenboden auf. Unter serumarmen Bedingungen oder bei hoher Zelldichte lässt sich dieser Prozess beschleunigen. Die zunächst morphologisch noch undifferenzierten, rundlichen Zellen nehmen langfristig eine epitheliale Differenzierung an. Sie werden spindelförmig und wachsen in einem Monolayer auf L-Lysin-beschichteten Gewebekulturflaschen, ähnlich den NSCLC-Zellen.

Diese Beobachtung wurde zunächst für die Linie NCI-H69 gemacht, von der sich eine primär adhärenz auf beschichteten Kulturflaschen wachsende Zelllinie NCI-H69ad etablieren ließ. Von einer durch Langzeitexposition Etoposid-resistenten Sublinie der NCI-H69 (NCI-RH69) konnte ebenfalls ein adhärenz Klon NCI-RH69ad gezogen werden.

Später gelang es für zwei weitere Linien, langfristig adhärenz Varianten zu entwickeln, N592ad und NCI-H82ad. Bemerkenswert ist, dass auch die in der Literatur als variant beschriebene Zelllinie NCI-H82, welche in Suspension wächst, zu einer epithelialen Differenzierung in der Lage war.

4.2.2.Charakterisierung der Varianten

Um Hinweise zu erhalten, ob es sich bei den adhärenz Zellen um variante Kleinzeller handelt, wurden zunächst für die Linie NCI-H69 und einige Subklone RT-PCRs durchgeführt. Hierbei wurde die Expression bestimmter Markergene für SCLC und NSCLC untersucht. Insbesondere fiel ein Verlust der neuroendokrinen Marker bei den adhärenz Klonen auf, was mit den bislang beschriebenen Charakteristika von varianten Zellen übereinstimmt.

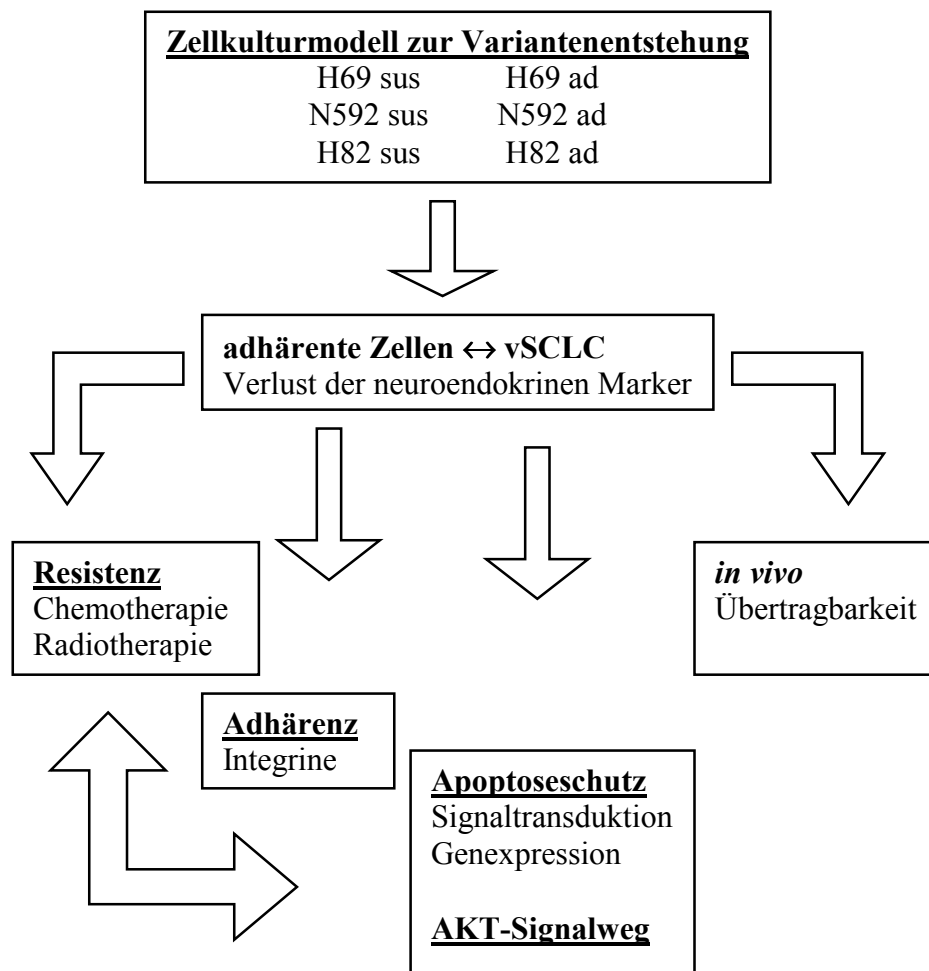
Bei Behandlung der Zellen mit Etoposid erwiesen sich die adhärenz Linien resistenter gegenüber dem Zytostatikum als die Suspensionszellen.

Diese beiden Experimente ergaben starken Hinweise auf ein *in vitro*-Korrelat zu den in Tumoren gefundenen varianten Zellen, zum einen durch den Verlust der neuroendokrinen Marker bei vSCLC-Zellen, zum anderen durch einen verstärkten Schutz gegen Zytostatika-induzierte Apoptose.

Durch die Arbeiten von Sethi, 99 und Moore, 98 entstand die Vermutung, der beobachtete Apoptoseschutz sei adhärenzbedingt und werde über einen PI3-Kinase-AKT-abhängigen Signalweg vermittelt.

Das dreiteilige Projekt, zu dem auch diese Arbeit gehört, beinhaltet folgende Aspekte:

Abbildung 11 :Das Projekt



4.3.Aufgabenstellung

Innerhalb des Projekts zur Variantenentstehung beim SCLC beschäftigt sich diese Arbeit mit der Untersuchung von Signaltransduktionswegen und der Expression von Genen, die bekanntermaßen an der Umdifferenzierung von Zellen beteiligt sind.

1) Signaltransduktion

Basierend auf vorliegenden Erkenntnissen von Sethi et al. und Moore et al. wurde der Schwerpunkt der Untersuchungen auf den AKT-Pathway gelegt, der in vielen Zellen einen Apoptoseschutz vermittelt und auch für eine erhöhte Resistenz der varianten Zellen gegenüber Chemotherapeutika und Bestrahlung sorgen könnte. Zunächst sollte mittels Western Blot-Analysen die Aktivität von AKT in der adhärennten Klonen mit den Suspensionszellen verglichen werden, und bei signifikanten Ergebnissen weitere Bemühungen in die Entschlüsselung der Mechanismen eines Apoptoseschutzes über

diesen Signalweg investiert werden. In diesem Kontext standen einige Mitglieder der BCL2-Familie und der Transkriptionsfaktor NFκB zur Untersuchung.

Da in vielen Tumoren eine erhöhte MAPK-Aktivität mit Mechanismen der malignen Transformation assoziiert wird und MAPK beteiligt ist an Differenzierungsvorgängen und substratadhärentem Wachstum, stellte die Untersuchung der adhärenenten Klone auf MAPK-Aktivität einen Nebenaspekt dieser Arbeit dar.

Als Methoden zu diesem Zweck wurden Western-Blot-Analysen, Immunpräzipitation und Bandshift-Assays durchgeführt.

2) Genexpression

Als Erweiterung der Erkenntnisse, die bereits im Rahmen der Vorarbeiten bezüglich der Genexpression von vSCLC-Charakteristika an der Linie NCI-H69 und ihre adhärenenten Vertreter erhoben wurden, sollten ebenfalls RT-PCR an einem erweiterten Panel durchgeführt werden. Dieser umfasste neben der NCI-H69 und ihrer adhärenenten Variante noch die SCLC-Linien NCI-H82 und N592 sowie ihre Varianten NCI-H82 ad und N592 ad. Gene von Interesse gehörten zu den folgenden Gruppen:

1. neuroendokrine Marker
2. Downstreamtargets von AKT
 - BCL2-Familie
 - NFκB
3. NFκB abhängige Gene
4. Integrine

3) Adhärenzvermittelte AKT-Aktivierung

Eine Schlüsselfrage der Arbeit bestand darin, ob die beobachtete Adhärenz und die AKT-Aktivierung sich gegenseitig bedingen, oder ob es sich um voneinander unabhängige Phänomene handelt. Dies impliziert die Annahme eines adhärenzbedingten Apoptoseschutzes bei varianten SCLC. Der Vermutung, dass Integrin-Expression und AKT-Aktivierung in Zusammenhang stehen, wurde ebenfalls nachgegangen.

Zu diesem Zweck wurde die Integrinexpression der Zellen untersucht und Experimente zum Ausschalten der Adhärenz mit nachfolgenden Western-Blot-Analysen durchgeführt.

5. Materialien

5.1. Chemikalien

Alle Chemikalien für Lösungen und Puffer wurden in p.a.-Qualität bezogen.

APS	Sigma Chemical Company, UK
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA	Sigma Chemical Company, UK
Chloroform	Sigma Chemical Company, UK
ECL Western Blotting Detection Reagenz	amersham pharmacia Biotech, Schweden
EDTA-Dinatriumsalz	Roth, Karlsruhe
EDTA	Boehringer Mannheim
0.022% in PBS(Ca^{2+} / MG^{2+} -frei) steril	
Essigsäure (Eisessig)	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxidplättchen	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$)	Merck, Darmstadt
Di-Natriumhydrogenphosphat	
($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$)	
PBS	Sigma Chemical Company, UK
Penicillin-Streptomycin-Neomycin Solution	Sigma cell culture, UK
Phenol	Roth, Karlsruhe
Phenol-Chloroform	Roth, Karlsruhe
RNAse AWAY	Molecular Bioproducts, California
RNAzol B	AGS, Heidelberg
Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
(30% Acrylamid, 0.8% Bisacrylamid)	
RPMI 1640 Medium mit L-Glutami	Gibco BRL, USA
Salzsäure	Sigma Chemical Company, UK
SDS	Serva, Heidelberg
TEMED	Sigma Chemical Company, UK
Trypsin	Boehringer Mannheim
1:250 2,5%	125 units/ml in PBS steril

5.2. Enzyme, Fertigpuffer und Nukleinsäuren

DNA-Größenstandards	
1Kb DNA-Ladder	Gibco BRL, USA
Desoxynucleotide:	
α - ³³ P dCTP	ICN
α - ³² P dCTP	ICN
γ - ³² P dATP	ICN
DNTPs (100mM)	Gibco BRL, USA
DTT 0,1M	Gibco BRL, USA, USA
5× Forward-Reaction Buffer	Gibco BRL, USA, USA
Klenowfragment	Boehringer Mannheim
Oligonucleotide(Primer)	TIB MOLBIOL, Berlin
Oligo(dT) Primer	Gibco BRL, USA, USA
10×PCR Reaction Buffer + Mg	Boehringer, Mannheim
10×Restriktionspuffer B	Boehringer, Mannheim
Protein A/C PLUS-Agarose	Santa Cruz Biotechnology
Protein-Marker:	
Phospho Plus [®]	New England Biolabs, USA
Biotinylated Protein Marker	
Prestained SDS-PAGE Standards,	Bio-Rad
Broad Range Marker	
RNase Inhibitor	Boehringer Mannheim
1 st Strand Buffer	Gibco BRL, USA, USA
Superscript TM Reverse Transkriptase	Gibco BRL, USA, USA
T4-Polynucleotid-Kinase	Gibco BRL, USA, USA
Taq-DNA Polymerase	Boehringer Mannheim
10× Zell-Lyse-Puffer	New England Biolabs, USA

5.3. Kits und Antikörper

Anti-Bad (rabbit anti-bad)	Stress Gen; Canada
Anti-Biotin HRP-Linked Antibody (goat anti-Biotin)	New England Biolabs, USA
Anti-Rabbit HRP-linked Antibody	New England Biolabs, USA
Anti Phospho-BAD (Ser136) (purified sheep IgG)	Upstate biotechnology, USA
Bio-Rad D _C -Protein Assay	
Reagenz A	
Reagenz S	
Reagenz B	
Phospho Plus AKT (Ser473) Antibody Kit	New England Biolabs, USA
Phospho Plus	
p44/42 MAP Kinase(Thr202/Tyr204) Antibody Kit	New England Biolabs, USA
Probe Quant G50 Micro Columns	
Amersham Pharmacia Biotech, Schweden	
NAP 10 Columns	
Amersham Parmacia Biotech, Schweden	

Tabelle 6: Oligonukleotide

Primer name	Genlocus	Product in Base Pairs	Optimale PCR-Bedingung	5'-Sequenz	3'-Sequenz
bad	Bad	282	56°C 32 cyc	5'- AGG ACG ACG AA GGA TGG-3'	5'-GGG ATG TGG AGC GAA GGT-3'
bax	Bax	132	49°C 30 cyc	5'- GAT GCG TGG ACC AAG AAG C-3'	5'- TGC CAC TCG GAA AAA GAC C-3'
bcl-2	bcl-2	174	53°C 30 cyc	5'- CAC CAA GAA AGC AGG AAA C-3'	5'- CAG GAT AGC AGC ACA GGA-3'
bcl-Xl	Bcl-Xl	245	58°C 30 cyc		
bfl-1	bfl-1; NFkB inducible anti apoptosis regulator	156	45°C 35 cyc	5'- GTT GCG GAG TTC ATA AT-3'	5'- TTG CTT CAG GAG AGA TAG-3'
b-IAP	inhibitor of apoptosis c; NFkB dependent	476	55°C 32 cyc	5'- GCA TTT TCC CAA CTG TCC-3'	5'- ACC TCA AGC CAC CAT CAC-3'
chromA	Chromogranin A	222	63°C 30 cyc	5'- CCG CTG TGT TTC TTC TGC TGA TGT G -3'	5'-TGA ATA AAG GGG ATA CCG AGG TG-3'
c-IAP	inhibitor of apoptosis b; NFkB dependent	218	53°C 35 cyc	5'- AGT GCG GGT TTT TAT TAT G-3'	5'- GTT GCT CTT TCT CTC TCC TC-3'
E-cadherin	E-cadherin	370	58°C 32 cyc	5'-CCC AAC TCC TCT CCT GGC C-3'	5'-CCT CCT GGG TGA ATT CGG GC-3'
GAPDH	control housekeeping gene GAPDH	299	58°C 20 cyc	5'-CGT CTT CAC CAC CAT GGA GA-3'	5'-CGG CCA TCA CGC CAC AGT TT-3'
GRP	Gastrin releasing peptide	122	61°C 28 cyc	5'-AGC AGA GAG TCT ACC AAC TTT GCC-3'	5'-AAC AGA AAC CAC CAG CCA CCT C-3'

Ialpha2	integrin alpha 2	242	56°C 30 cyc	5'- ATG TTG TGG TTG TGT GTG ATG-3'	5'- TCC GAA TGT GTT TGT GAG G- 3'
Ialpha3	integrin alpha3	306	55°C 32 cyc	5'-CGA GAG GAA AGA GGA AGT AGG-3	5'- AGG GAA TAG CCG AAG GTG-3
Ialpha6	integrin alpha 6	219	56°C 32 cyc	5'- TGC TTG CTC TAC CTG TCG -3'	5'- CGT TCT GTT GGC TCT CTG-3'
Ibeta1	integrin beta 1	239	52°C 30 cyc	5'- GCA AAT CCC ACA ACA CTG-3'	5'- AGG TCA AAA AGG CAC AAT G- 3
Ibeta3	integrin beta 3	246	58°C 32 cyc	5'- AGA GCA AAA TGG GAC ACA G-3'	5'- TGA GGA GAA AGA AGA GAA TGA G-3'
Ibeta4	integrin beta 4	466	56°C 32 cyc	5'- ATC AGC GTC AGC CTC TCT-3'	5'- TGC CAA ATC CAA TAG TGT AGT C-3'
Ibeta6	integrin beta 6	339	56°C 35 cyc	5'-ACC AAC CTG TGA ACG ATG TC-3	5'- ACC CCG ATG AGA AGA GTA GC-3
ILP	IAP-like protein; NFkB dependent	418	53°C 32 cyc	5'- AGT GCT TTT GTT GTG GTG -3'	5'- TAT TCT TGT CCC TTC TGT TCT A-3'
L-dopa	L-dopa-decarboxylase	219	61°C 27 cyc	5'- AGA GGG AAG GAG ATG GTG GAT TAC-3'	5'-TGG GGA AGT AGG CGA AGA AGT AG-3
lung RP	Lung resistance protein	200	54°C 30 cyc	5'-GGA GGA GTG GCT GGT AAC -3	5'-CTG GCT GGA GGA AAA AAG - 3'
MRP	multi resistance protein	391	51°C 32 cyc	5'-CTT GGG ATT TTT GCT GTG- 3	5'- ATT AGG GTC GTG GAT GGT-3
NFkB	NFkB	281	55°C 32 cyc	5'- AGG AGA GGA TGA AGG AGT TG-3'	5'- TTT TGG AAG GAG CAG GAC-3'
NSE	Neuron specific enolase	159	53°C 35 cyc	5'- CTG TGG TGG AGC AAG AG- 3'	5'- GAG CAA TGT GGC GAT AC-3'
paxillin	paxillin	228	54°C 28 cyc	5'- GCA GCC TCA GTC CTC ATC -3'	5'- ACA GCG TTC AGT TCC AGC-3'
survivin	survivin; NFkB inducible anti apoptosis reg.	220	53°C 35 cyc	5'- CCC CTT AGC AAT GTC TTA G-3'	5'- TTC TTC CTC CCT CAC TTC -3'

5.5. Lösungen, Puffer und Nährmedien

Alle Lösungen, Puffer wurden, wenn nicht anders angegeben, mit entmineralisiertem Wasser angesetzt und gegebenenfalls steril gefiltert. Der pH-Wert wurde, wenn nicht anders angegeben, mit Salzsäure oder Natronlauge eingestellt.

Anodenpuffer 1	0.3M Tris 20% Methanol
Anodenpuffer 2	25mM Tris 20% Methanol
Block-Puffer	1× TBS 0.1% Tween-20 5% Magermilchpulver
BSA-Stammlösung	2mg/ml
Ethidiumbromidstammlösung	10mg/ml
Ethidiumbromidfärbebad	1µg/ml
Gelladepuffer	
5×SDS-PAA-Gelladepuffer	1M Tris-Cl pH6.8 10% SDS 0.5M DTT 50% Glycerol 0.5% Bromphenolblau
6×PAA-Gelladepuffer	98% Formamid 10mM EDTA(pH 8.0) 0.25% Bromphenolblau 0.25% Xylencyanol
0.1M Glycin pH 2.5	pH eingestellt mit Essigsäure
Hochsalzpuffer	20mM HEPES 1.5mM MgCl ₂ 420mM NaCl 0.2mM EDTA 25% Glycerin 0.5mM DTT 0.2mM PMSF 1M Kaliumchlorid
Kathodenpuffer	25mM Tris 40mM ε-Amino-n-caproic-acid 20% Methanol
Medium	
RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin	50ml FKS
Penicillin/Streptomycin/Neomycin	5ml auf 500ml Medium
10mM Natriumphosphatpuffer, pH 7.3	20mM NaH ₂ PO ₄ ×H ₂ O 80mM Na ₂ HPO ₄ ×H ₂ O

Niedrigsalzpuffer	10mM HEPES 1.5mM MgCl ₂ 10mM KCl 0.5mM DTT 0.2mM PMSF pH 7.9
PBS	8g NaCl 0.2g KCl 1.15g Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O 0.2g KH ₂ PO ₄ auf 1l Aqua bidest. pH 7.4
Ponceau-S-Färbung:	
Fixierungslösung	50% Methanol 10% Eisessig
Färbelösung	50% Methanol 10% Eisessig 0.1% Ponceau-S
Entfärbungslösung	7% Eisessig 5% Methanol
Protein-Lyse-Puffer	10× Lysis-Buffer 100µl 100mM PMSF 9.9µl H ₂ O auf 1ml
10× SDS-Laufpuffer	0.25M Tris 1.92M Glycerol 1% SDS
10× TBE-Puffer	240g Borsäure 200ml 0.5M EDTA 540g Tris, pH 8.0 H ₂ O auf 5l
10× TBS-Puffer	25.2g Tris 80g NaCl H ₂ O auf 1l pH 7.6
1M Tris-Cl	pH 6.8 pH 8.0
Trypsin	2,5% in PBS steril
Waschpuffer	1× TBS 0.1% Tween-20

5.6. Gele

SDS-Gel:	für Mini-Kammer
Laufgel:	
30% PAA-Fertiglösung	1.33ml
1M Tris.Cl pH8.8	1.00ml
20% SDS	15µl
H ₂ O	1.66ml
10% APS	15µl
TEMED	10µl
Sammelgel:	
30% PAA-Fertiglösung	418µl
1M Tris-Cl, pH 6.8	313µl
H ₂ O	1.75ml
10% APS	13µl
20% SDS	12.5µl
TEMED	10µl
PAA-Gel	
für Bandshift-Assay	4% PAA-Gel
40% PAA-Stammlösung	10ml
5×TBE	10ml
H ₂ O	80ml
10% APS	700µl
TEMED	70µl
für RT-PCR	
6% PAA-Stammlösung	30%PAA 100ml
	10×TBE 25ml
	H ₂ O auf 500ml
Pro Gel:	
Stammlösung	25ml
10% APS	250µl
TEMED	25µl

5.7. Reaktionsgemische

5.7.1. cDNA-Synthese

Pro Ansatz	
RNA(1µg/7.5µl)	7,5µl
Oligo dT-Primer(0.5µgµl)	2 µl
5fach Reaction-Buffer	6 µl
0.1M DDT	3 µl
dNTPs(je 1.25mM)	8 µl
RNAse Inhibitor(40U/ml)	1.5µl
RT Superscript 2 (200U/µl)	2 µl
	30 µl

5.7.2. RT-PCR

Pro Ansatz

cDNA(1µg/µl)	1 µl
H ₂ O	26 µl
dNTPs(je 1.25mM)	8 µl
10×Puffer+MgCl ₂	5 µl
<i>Taq</i> -Polymerase (1U)	0.2µl
3'-Primer (0.1µg/µl)	5 µl
5'-Primer (0.1µg/µl)	5 µl
α ³³ P dCTP(0.1µl=1µCi)	0.1µl

5.7.3. Bandshift-Assay

Pro Ansatz

H ₂ O	7.5µl
5×BSB-(HB)	4 µl
BSA(10µg/µl)	1 µl
Poly dIdC	1.5µl
1M KCl	3 µl
Oligo (20000cpm)	1 µl
Kernextrakt	2 µg

5.8. Geräte

Autoklav

Melag

Brutschrank für Zellkultur

Heraeus, Hanau

Digitalphotometer Ultrospec 3000

Pharmacia Biotech, Schweden

Elektrophoresekammern

Gibco BRL, USA

Filme

Kodak Biomax MR Film

Eastman Kodak, USA

Geltrockner Model 583

Bio-Rad, München

Heizblock Techne Dri-Block DB 3

Thermo-Dux, Wertheim

Magnetrührgerät IKA COMBIMAG RCO

IKA-Werk, Staufen i. Breisgau

Millipore Immobilion P Transfer-Membran

Millipore, Bedford

PCR-Cycler

Robo Cycler Gradient 40

Stratagene, USA

pH-Meter CG 840

Wiss. techn. Werkstätten, Weilheim

Pipetten und Pipettenspitzen:

Eppendorf Multipette 4780

Eppendorf Gerätebau, Hamburg

Gilson-Pipetten 0.5-10 µl

Gilson, Frankreich

2-20µl

10-100µl

10-200µl

100-1000µl

Gilson-Pipettenspitzen

Gilson, Frankreich

Pipetboy acu

Integra Biosciences, Schweiz

Reaktionsgefäße

Falcon Tubes, 50ml

Falcon, USA

Falcon Tubes, 15ml

Falcon, USA

Eppendorf-Tubes, 2.0ml

Eppendorf Gerätebau, Hamburg

1.5ml

0.5ml

Röntgenfilmentwicklungsgerät QX 60

Sakura, Japan

Röntgenkassetten

Eastman Kodak, USA

Schüttelinkubator Kottermann 4010

Kottermann, Ütze-Hänigsen

Spannungsquelle LKS EPS 500/400

Pharmacia Biotech, Schweden

Vakuum-Pumpe Hydro Tech

Bio-Rad, München

Vortex Reax 2000

Heidolph, Hamburg

Waagen

PE360 Delta Range

Mettler, Schweiz, Schweiz

AE160

Mettler, Schweiz, Schweiz

Western – Blotkammer

Phase, Lübeck

Whatman-Papier

Whatman Lab Sales, USA

Zentrifugen

Biofuge 13 Tischzentrifuge

Heraeus, Hanau Seratech

Biofuge 15R

Heraeus, Hanau Seratech

5.9. Zelllinien

Für die Experimente wurden Zelllinien des kleinzelligen Bronchialkarzinoms, sowie einige NSCLC-Linien als Kontrollen kultiviert. Von den SCLC bestanden jeweils die ursprüngliche Suspensionsform und die adhärente Variante.

Die Linien sind im Einzelnen beschrieben :

Tabelle 7: Zelllinien

NCI-H69 _{sus}	SCLC
NCI-H69 _{ad}	adhärente Variante
N592 _{sus}	SCLC
N592 _{ad}	adhärente Variante
NCI-H82 _{sus}	als variant beschriebenes SCLC
NCI-H82 _{ad}	adhärente Form von H82
NCI-H841	SCLC, adhären
EPLC-32MI	Plattenepithelkarzinom
NCI-H23	Adenokarzinom
LCLC-H103	großzelliges Bronchialkarzinom

6. Methoden

6.1. Zellkultur

6.1.1. Zellkulturmodell

Für Proteinextraktionen und Kernextraktionen wurden sieben Bronchialkarzinom-Zelllinien kultiviert. Die klassischen kleinzelligen Linien NCI-H69 (im Folgenden H69) und N592, sowie deren adhärent wachsende Varianten, ein varianter Kleinzeller, NCI-H82 (im Folgenden H82) und seine adhärente Form, und die großzellige Bronchialkarzinomlinie LCLC-H103 (im Folgenden H103), adhärent wachsend.

Kultiviert wurde in 250 ml Gewebekulturflaschen mit L-Lysin-Beschichtung. Das Lysin simuliert *in vitro* die extrazelluläre Matrix, die essentiell für adhärent wachsende Zellen ist. Als Medium wurde RPMI 1640 Medium mit Glutamin, unter Zusatz von 10% FKS und Penicillin-Streptomycin-Neomycin (5 ml auf 500 ml Medium) verwendet.

Ein Mediumwechsel erfolgte alle drei bis fünf Tage, dabei wurden die Suspensionszellen auf $\frac{1}{4}$ der Zellzahl verdünnt und weiterkultiviert.

Die adhärenenten Zellen wurden einmal wöchentlich geteilt und 1/10 der Zellen weiterkultiviert. Zu diesem Zweck wurde das Medium abgenommen, der Zellrasen mit 5ml PBS gespült und nach Benetzung des Rasens mit 2 ml Trypsin (3ml 2,5% Trypsin / 125 units/ml; EDTA 0,02% in 100ml PBS) 5 min im Brutschrank inkubiert. Durch die Protease Trypsin wurden die Zellen von ihrem Untergrund gelöst. Jeweils 1/10 der Zellen wurde in 15 ml neuem Medium weiterkultiviert.

NCI-H82ad und H103 proliferierten schneller als die anderen Zelllinien und wurden deshalb zweimal wöchentlich geteilt.

6.1.2. Zellkultur auf unbeschichteten Bakterienkulturschalen

Die adhärenenten Zelllinien H69ad und H592ad wurden auch auf unbeschichteten Bakterienkulturplatten kultiviert, wie sie zum Gießen von Agarböden verwendet werden, um den Einfluss von fehlender L-Lysin-Beschichtung auf das Adhärenzverhalten der Zellen zu untersuchen.

Ziel dieses Experimentes war, durch die fehlende Beschichtung der Platten eine Assoziation des Zellzytoskeletts mit dem Untergrund zu verhindern und so den adhärenenten Phänotyp der Zellen aufzuheben. Im Anschluss erfolgte eine Herstellung von Proteinextrakten der Zellen und nachfolgende Western-Blot-Analyse zur Untersuchung der AKT-Aktivität (Western-Blot s.u.).

Dazu wurden die in Gewebekulturflaschen wachsenden Zellen wie oben beschrieben trypsinisiert und 9cm Ø Bakterienkulturschalen mit je 1ml Zellsuspension beimpft.

Kultiviert wurden die Zellen im beschriebenen 10 ml RPMI 1640 Medium mit Zusatz (s.o.) für eine Woche im Brutschrank. Der Mediumwechsel erfolgte zweitägig. Als nach einer Woche nahezu alle Zellen in Suspension übergegangen waren, wurden sie zur Vorbereitung für die Proteinextraktion für 24h serumfrei gehalten. Die Proteinextraktion erfolgte nach dem beschriebenen Protokoll für Suspensionszellen.

6.2. Methoden zur Proteinchemie und Signaltransduktion: Western-Blot

Beim Western-Blot (Tobwin 1979; Burnette 1981) werden die einzelnen Komponenten einer Proteinmischung mittels Gelelektrophorese getrennt. Danach erfolgt im eigentlichen Western-Blot ein Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran mittels eines elektrochemischen Gradienten. Dieses Blotten der Proteine auf eine Membran hat den Vorteil, dass die Membran als Trägermatrix die Proteine immobilisiert und sie so immunochemischen Nachweisverfahren zugänglich macht.

Hierzu wird die Membran mit Antikörpern gegen zu untersuchende Proteine inkubiert, die anschließend durch eine Farb- oder Chemolumineszenzreaktion sichtbar gemacht werden. Im speziellen Fall diente die Methode zur Feststellung von Expressionsunterschieden zwischen den klassischen SCLC und deren adhärenenten Varianten auf aktiviertes, d.h. phosphoryliertes, AKT (dem in der Einleitung beschriebenen Apoptoseinhibitor), BAD (ein Protein, downstream von AKT) und MAP-Kinase.

Verwendet wurden jeweils Antikörper gegen das phosphorylierte Protein und gegen das Gesamtprotein. Dieses diente auch als Kontrolle, um den Anteil von phosphoryliertem Protein am jeweiligen Gesamtprotein zu erfassen.

Tabelle 8: Einzelschritte des Western-Blots

- Proteinextraktion aus Zellkulturmaterial
- Konzentrationsbestimmung nach Lowry
- SDS-Gelelektrophorese
- Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran
- Blocken der Membran
- Inkubation mit dem Primärantikörper (gegen das untersuchte Protein)
- Inkubation mit dem Sekundärantikörper (gegen den Primärantikörper)
- Detektionsverfahren

6.2.2. Proteinextraktion

Für Westernblot-Analysen wurden Proteinextrakte der oben genannten Zelllinien angefertigt. Vorbereitend wurden die Zellen 24h unter serumfreien Bedingungen gehalten, d.h. im genannten Medium ohne FKS und Antibiotikazusatz.

Dies wurde vorgenommen, um die Basis-Aktivität der untersuchten Proteine nachzuweisen ohne den Einfluss von Wachstumsfaktoren.

5.2.2.1. Proteinextraktion aus adhärenenten Zellen

Die adhärenent wachsenden Zellen wurden ebenfalls für 24h serumfrei gehalten. Danach wurde von der 250 ml Gewebekulturflasche das Medium abgesaugt und der Zellrasen zweifach mit je 5 ml eiskaltem PBS gewaschen, um die Mediumreste und Zelltrümmer zu entfernen .

Das Medium wurde abpipettiert, PBS zugegeben und die Flasche einige Male geschwenkt, um die Flüssigkeit auf dem Zellrasen zu verteilen. Dann wurde die Kulturflasche auf Eis inkubiert, während der Lysis-Buffer

(s. Materialien) erstellt wurde.

Dieser enthielt PMSF als Detergenz, welches nur 30 min stabil ist. Aus diesem Grund wurde der Lysis-Buffer immer unmittelbar vor der Proteinextraktion fertiggestellt. Nach Entfernung des PBS wurden die Zellen mit 700µl Lysis-Buffer, durch Schwenken der Flasche verteilt, zunächst für 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen mit

Hilfe eines Zellschabers vom Flaschenboden gelöst und die Zellsuspension weitere 5 min auf Eis inkubiert.

Dieser zweite Inkubationsschritt ist sinnvoll, um die abgeschabten Zellen von allen Seiten von Lysis-Buffer zu umspülen, damit sich die Proteine besser lösen.

Anschließend wurde die Suspension in ein Eppendorfgefäß überführt und für 10 min bei Raumtemperatur in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand mit den Proteinen wurde in ein neues Eppendorfgefäß gefüllt und bei -80°C eingefroren.

5.2.2.2. Proteinextraktion bei Suspensionszellen

Die Suspensionzellen wurden mitsamt des Mediums in ein 50ml-Falcontube überführt und bei 800UpM 10min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Absaugen des Mediums wurde das Zellpellet mit 5ml eiskaltem PBS gewaschen und wiederum 10 min bei 4°C und 800UpM zentrifugiert.

Nach Verwerfen des Überstandes wurden jeweils 750 μl Lysis-Buffer zugesetzt, mit den Suspensionszellen gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Zum Schluss wurde noch einmal gemischt, indem der Inhalt des Falcontubes mehrmals auf- und abpipettiert wurde. Die Suspension wurde in Eppendorfgefäße überführt und bei Raumtemperatur 10 min bei 10000UpM in einer Eppendorftischzentrifuge zentrifugiert.

Der Überstand wurde aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

6.2.3. Proteinkonzentrationsbestimmung nach Lowry

Die Konzentrationen der Proteinextrakte wurden mittels Absorptionswerten in einem Digital-Photometer unter Durchführung des D_C Potein Assays von BIO-RAD gemessen. Dieser bestand aus drei Reagenzien A, S und B, deren Zusammensetzungen in der Herstellerbeschreibung nicht aufgeführt sind. Die Anwendung des Verfahrens führte zu einer konzentrationsabhängigen Blaufärbung der Proteinlösung, die photometrisch quantifiziert werden konnte durch Vergleich mit einem Standard. Das Protokoll des Herstellers wurde wie folgt modifiziert:

Zunächst wurde eine Eichkurve mit einer BSA-Lösung in definierter Konzentration erstellt. Die zu messenden Proteinkonzentrationen wurden jeweils in

Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Umrechnung der Absorptionswerte in Konzentrationen erfolgte anhand der Eichkurve.

Nach kurzem Vortexen wurde jeweils 100 µl von der Reagenz A' (1ml Reagenz A + 20µl Reagenz S) zugegeben und erneut gevortext.

Jeder Probe wurden 800µl der Reagenz B zugegeben, geschüttelt und 15 min in Dunkelheit inkubiert.

Zur Absorptionsmessung bei 750nm wurde zunächst das Digitalphotometer mit dem Leerwert geeicht und dann die Werte ermittelt.

6.2.4. Western Blot

Zunächst wurde eine Gelelektrophorese der gewonnenen Protein-Extrakte in einem 10% PAA-Gel durchgeführt.

Das verwendete Gel bestand aus zwei Schichten, dem 10 % PAA Laufgel und dem Sammelgel mit den Proteintaschen, ein 5% PAA Gel mit niedrigerem pH-Wert, was dazu diente, die Proteine zu denaturieren.

Eingesetzt wurden jeweils 20µg Protein, die auf Eis mit ¼ des Gesamtvolumens an 5× Probenauftrags-Puffer versetzt und vor Beladung der Geltaschen zunächst bei 95°C für 5 min denaturiert wurden.

Die SDS-Gelelektrophorese erfolgte für 90 bis 120 min bei 90Volt.

Zur Vorbereitung des eigentlichen Blots wurde die PVDF-Membran 5 min in Methanol getränkt, um das enthaltene Wasser zu entfernen und sie positiv aufzuladen. Nach einem kurzen Wasserbad wurde sie noch 5 min in Anodenpuffer 2 (siehe Materialien) geschwenkt. Wichtig war bei allen Arbeitsschritten das Tragen von Handschuhen und Benutzen einer Pinzette, um die Membran nicht mit Fremdprotein zu verunreinigen.

Zum Aufbau des Blots wurden Whatmanpapiere in Methanol-Tris-Puffern getränkt (Materialien), die eine steigende Konzentration aufwiesen und somit zum Aufbau des chemischen Gradienten dienten. Diese wurden mit der Membran und dem Gel nach Herstellerangaben des verwendeten Blotgeräts geschichtet und bei 250mA für 1 h geblottet.

Danach konnten die nun auf der Membran befindlichen Proteine mit Antikörpern beschichtet werden.

Für die Immundetektion wurde die Membran zunächst für 5 min auf dem Schüttler mit Waschpuffer (TBS Tween; Materialien) gewaschen und anschließend für eine Stunde in Magermilchpuffer (Materialien) geblockt. Da das Milchprotein an die Membranproteine

bindet, konnten auf diese Weise die unspezifischen Bindungen des verwendeten Antikörpers vermindert werden.

Für die AKT und MAPK-Detektion wurden Antikörperkits von New England Biolabs verwendet, die Antikörper gegen das phosphorylierte und das Gesamtprotein enthielten. Die beschriebenen Antikörper wurden in einem 10 ml Ansatz mit Waschpuffer auf 1:1000 verdünnt und mit der Membran in eine Folie eingeschweisst. Über Nacht wurde bei 4°C inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift (3×5min; s.o.) wurde die Membran mit einem zweiten Antikörper, der 1:2000 mit Block-Puffer verdünnt war (10ml Gesamtvolumen), für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Hierbei handelte es sich um einen Anti-Rabbit Antikörper gegen den verwendeten Primärantikörper.

Danach wurde die Membran wieder 3×5min gewaschen und die Immunreaktion mit ECLTM Western blotting detection reagents von amersham pharmacia (verwendet nach Herstellerangaben) detektiert.

Sollte die Membran mehrfach verwendet werden, so wurde sie 20min mit einer 1M Glycinlösung pH 2.5 behandelt, so dass sich der Antikörper vom Protein löste. Nach einem einstündigen Waschschrift mit TTBS wurde erneut geblockt und über Nacht inkubiert mit einem anderen Antikörper.

Dieses Verfahren ließ sich ein bis zweimal durchführen, ohne dass die Proteine zerstört wurden. Anzumerken ist, dass nach dieser Säurebehandlung kein Antikörper gegen phosphorylierte Proteine mehr eingesetzt werden konnte, da die Phosphorgruppen dabei zerstört werden. Beim Vergleich von phosphoryliertem Protein zum Gesamtprotein wurde diese Methode regelmäßig angewandt, um nicht durch Pipettierfehler falsche Ergebnisse zu erhalten, sondern um bei einer identen Membran Vergleiche bezüglich des Phosphorylierungsgrades eines bestimmten Proteins anstellen zu können.

6.2.5. Immunpräzipitation

Im Falle, dass ein untersuchtes Protein im Extrakt in sehr geringen Mengen vorhanden ist, kann zunächst eine Anreicherung des Proteins durch Immunpräzipitation erfolgen.

Eine größere Menge Proteinextrakt wird mit einem Antikörper inkubiert. Anschließend werden Agarosepartikel hinzugegeben, an die sich der Antikörper, der nun das zu konzentrierende Protein gebunden hat, anlagert. Durch Zentrifugation werden die Agarosepartikel mitsamt des gebundenen Proteins vom Überstand getrennt und weiterverwendet.

Um sicherzustellen, dass der verwendete Antikörper spezifisch bindet, wird eine sichere Positivkontrolle, d.h. Proteinextrakt, der das entsprechende Protein enthält, mit einem anderen Antikörper, beispielsweise Anti-Rabbit-IgG, inkubiert. Wenn bei der anschließenden Immundetektion im Western Blot keine Bande erscheint, ist davon auszugehen, dass der verwendete Antikörper spezifisch bindet.

Um die schon mehrfach beschriebenen Zelllinien hingehend ihrer BAD-Phosphorylierung untersuchen zu können, wurde vorher eine Immunpräzipitation mit einem BAD-Antikörper vorgenommen.

Zur Vorklärung wurde je 500µg Protein mit 20µl Protein A/G PLUS Agarose für 1h in Eppendorfgefäßen auf dem Schüttler bei 4°C inkubiert, und zwar derart, dass die Gefäße ständig routierten. Anschließend wurde für 5min bei 5000UpM in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß gegeben. Je Probe wurden 3.5µl Anti-BAD Rabbit polyclonal Antikörper von Stressgen beigelegt und das Eppendorfgefäß wie oben beschrieben 2h auf dem Schüttler inkubiert. Als Kontrolle wurde bei einer Probe (N592ad) anstatt Anti-BAD 3,5µl eines Anti-Rabbit IgG Antikörpers hinzugefügt. Dann wurden je 30µl Protein A/G PLUS-Agarose hinzugegeben und eine weitere Stunde geschüttelt. Danach wurde wieder für 5min bei 5000UpM zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Das Pellet wurde dreifach mit je 1 ml PBS gewaschen. Um die Proteine wieder von der Agarose zu lösen, wurde das Pellet mit 5µl 5× Probenauftrags-Puffer versetzt und bei 95°C für 5 min denaturiert.

Wie beim Western-Blot beschrieben, erfolgte eine Auftrennung des präzipitierten Proteins durch Gelelektrophorese in einem 10% PAA-Gel und der Transfer auf eine PVDF-Membran.

Als Primärantikörper wurde ein Anti-phospho-BAD (Ser136) von Upstate nach abgewandeltem Herstellerprotokoll verwendet. Zunächst wurde wie beschrieben für 1h mit TTBS 5% Magermilchpulver (s.Materialien) geblockt. Der Primärantikörper wurde 1:200 in 10ml mit TBS 5% Magermilchpulver verdünnt und mit der Membran über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Das weitere Vorgehen ist bereits oben beschrieben worden.

6.3. Methoden zur Genexpression

6.3.1. Reverse-Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Um Unterschiede in der Expression einiger Gene nachzuweisen, wurde bei den beschriebenen Zelllinien sowie einer Reihe weiterer SCLC und NSCLC RT-PCRs durchgeführt.

Im Allgemeinen wird bei einer Polymerase-Kettenreaktion DNA durch eine DNA-Polymerase vervielfältigt. Das Verfahren wurde 1987 von Kary B. Mullis entwickelt und machte es möglich, *in vitro* bestimmte Gensequenzen enzymatisch massenhaft zu amplifizieren und so beispielsweise selbst kleinste Genfragmente einer Analyse zugänglich zu machen.

Das Prinzip der PCR ist dem natürlichen Replikationsvorgang in der Zelle nachempfunden. Eine DNA-Polymerase synthetisiert von einem bestimmten Startpunkt an der einsträngigen DNA-Matrize ausgehend einen neuen DNA-Strang. *In vitro* übernimmt diese Aufgabe eine hitzestabile DNA-Polymerase (z.B. die *Taq*-Polymerase aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus*). Um spezifische Abschnitte des Genoms zu amplifizieren, werden kurze gegenläufige Oligonukleotide, sogenannte Primer, eingesetzt, deren Sequenz dem zu vervielfältigenden Genabschnitt entspricht. Dank des hitzestabilen Enzyms ist eine zyklische Wiederholung der Reaktionsschritte mit jeweils exponentieller Zunahme der Reaktionsprodukte möglich, ohne nach jedem Zyklus erneut Enzym zugeben zu müssen.

Zu Beginn des PCR-Zyklus erfolgt eine thermische Denaturierung der Matrizen-DNA bei 94°C, um den Doppelstrang in Einzelstränge zu spalten. Anschließend lagern sich bei einer primerspezifischen Hybridisierungstemperatur (sog. Annealingtemperatur) die Primer an den Matrizenstrang an. Auf diese Weise wird die Amplifikation der zwischen den Primern befindlichen Genabschnitte durch die *Taq*-Polymerase eingeleitet. Die Verwendung eines Thermocyclers ermöglicht die automatische Steuerung des Zyklusablaufs.

Dieses grundsätzliche Verfahren der Erbgut-Reduplikation liegt auch der Reversen-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion, kurz RT-PCR, zugrunde. Mit Hilfe der Reversen Transkriptase lassen sich spezifisch RNA-Sequenzen amplifizieren, wobei zunächst eine cDNA mit RNA als Matrize synthetisiert wird. Im zweiten Schritt folgt eine herkömmliche PCR, in der diese cDNA als Matrize eingesetzt wird.

Die Art der verwendeten Primer für die cDNA-Synthese richtet sich nach der Zielsetzung des Experiments. Bei den in diesem Fall eingesetzten Oligo(dT)Primern handelt es sich um 15-20 bp lange Oligonukleotide, die am 3'-Ende der mRNA binden. Hiermit findet eine selektive mRNA-Synthese (2-4% der Gesamt-RNA) statt.

Tabelle 9: Einzelschritte der RT-PCR

- | |
|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • RNA-Extraktion aus Zellkulturmaterial • Synthese der cDNA mit Reverser Transkriptase • PCR-Schritt mit cDNA als Matrize • PAA-Gelelektrophorese der PCR-Produkte • Autoradiogramm |
|---|

6.3.3. RNA-Extraktion mit RNAzol™ B

Vor der RNA-Extraktion wurden die Zellen für 24h in serumfreiem Medium gehalten, um vergleichbare Zellbedingungen wie bei den Western-Blots vorzufinden. Zügiges Arbeiten unter Kühlung der Proben war essentiell, um die RNA nicht durch RNAsen zu schädigen. Das verwendete RNAzol™B enthält Mercaptoethanol als Oxidationsschutz und Guanidin–Thiocyanat zum Herauslösen der RNA aus der Zelle. Da diese Substanz zelltoxisch ist, wurden Handschuhe getragen.

5.3.3.1. RNA-Isolierung bei Suspensionszellen

Die in 250ml Gewebekulturflaschen gehaltenen Zellen wurden zunächst 24h unter serumfreien Bedingungen inkubiert.

Dann wurden die Zellen mitsamt dem Medium in 50 ml Falcontubes 5min bei 800UpM und 4°C zentrifugiert, das Medium verworfen und das Zellpellet mit 5ml PBS gewaschen. Nach einem analogen Zentrifugationsschritt wurde der Überstand abpipettiert und dem Zellpellet 800µl RNAzol™B und 100µl Chloroform zugesetzt. Die Suspension wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und kurz gevortext.

Nach einer Inkubationszeit von 5min auf Eis wurde 15min bei 12000UpM zentrifugiert und die obere Phase, in der sich die gelöste RNA befand, in ein neues Eppendorfgefäß gegeben.

Mit der identen Menge Isopropanol wurde der Gefäßinhalt versetzt und 30 bis 60 min auf Eis inkubiert. In einer Eppendorftischzentrifuge wurde 15min bei 12000UpM zentrifugiert und anschließend der Überstand verworfen. Mit 500µl 70% Ethanol wurde das Pellet gewaschen. Erneut wurde für 8min bei 7500UpM zentrifugiert und die Flüssigkeit exakt abpipettiert. Im Heizblock wurde das Pellet bei 60°C und offenem Deckel glasig getrocknet.

Zum Schluss wurde das RNA-Pellet in 200µl sterilem Wasser gelöst, indem einige Male abwechselnd für 5min bei 60°C im Heizblock und auf Eis inkubiert und das Gefäß zwischendurch mehrfach geschwenkt wurde. Der Extrakt wurde bei -80°C eingefroren.

5.3.3.2. RNA-Isolierung bei adhärennten Zellen

Nach einer Inkubation unter serumfreien Bedingungen für 24h wurde das Medium abpipettiert und der Zellrasen zweifach mit PBS gewaschen. 800µl RNAzolTMB und 100µl Chloroform wurden unmittelbar auf den Zellrasen gegeben und durch Schwenken der Kulturflasche gleichmäßig verteilt. Anzumerken ist, dass die Zellen vorher nicht trypsinisiert werden dürfen. Die Kulturflasche wurde 5min auf Eis inkubiert. Danach konnten die Zellen mit einem Gummispatel zusammengeschaht werden, um sie in ein Eppendorfgefäß zu überführen. Dieses wurde 15min bei 12000 zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß gegeben. Ab diesem Arbeitsschritt wurde mit Suspensionszellen und adhärennten Zellen gleichermaßen verfahren.

6.3.4. RNA-Quantifizierung und Reinheitskontrolle

Die Konzentrationsbestimmung der RNA-Extrakte erfolgte mittels photometrischer Messung der Absorption bei 260nm in einem Digitalphotometer. Dazu wurde eine Präzisionsküvette aus Quarzglas mit einer Schichtdicke von 10mm verwendet und das Messgerät zunächst mit sterilem Wasser geeicht. Danach wurden die RNA-Extrakte unverdünnt gemessen, wobei die Küvette zwischen den einzelnen Messungen immer wieder mit Wasser gespült und trocken pipettiert wurde. Anhand der Absorption wurde die Konzentration errechnet, wobei 1.0A bei der verwendeten Küvette einer Konzentration von 40µg/ml entsprach.

Aus einer zweiten Messung bei 280nm wurde das Absorptionsverhältnis A260/A280 ermittelt, um die Reinheit der RNA zu überprüfen. Bei Quotienten um 2.0 lag reine RNA vor.

6.3.5. cDNA-Synthese

Um gleiche Konzentrationen an cDNA zu erhalten, wurde zunächst die eingesetzte RNA einheitlich auf 1µg/7,5µl verdünnt.

Je 7,5µl dieser RNA-Verdünnungen wurden in 0,5ml Eppendorfgefäße gegeben und 10 min bei 70°C in einem Thermoblock denaturiert. Danach wurden die Proben auf Eis gelagert und zügig gearbeitet, um die Qualität der RNA nicht zu beeinträchtigen.

Während der Denaturierungszeit wurde das Reaktionsgemisch, bestehend aus OligoDT-Primern, einem Reaktionspuffer, DDT, dNTPs, RNase-Inhibitor und dem Enzym SuperscriptTM im Gesamtansatz für alle Proben zusammenpipettiert (genaue Mengenangaben siehe Materialien). Das Enzym wurde aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit zum Schluss dazugegeben. Zu den denaturierten Proben wurde je 22,5µl des Reaktionsgemisches zugegeben, kurz zentrifugiert und bei 37°C im Heizblock für 2h inkubiert. Anschließend wurde für 10min bei 95°C denaturiert und die fertige cDNA bei -20°C gelagert.

6.3.6. Eigentliche RT-PCR

Um die Qualität der synthetisierten cDNA zu überprüfen und sicherzustellen, dass alle cDNAs dieselbe Konzentration aufweisen, wird als erstes für ein sogenanntes Strukturgen, die GAPDH, eine PCR durchgeführt, deren Prinzip sich auf alle weiteren durchgeführten PCRs übertragen lässt.

Bei Durchführung einer PCR muss verstärkt auf sterile Bedingungen und zügiges Arbeiten auf Eis geachtet werden, um eine Kontamination oder Qualitätsverschlechterung der Proben zu vermeiden. In autoklavierte 0,5ml Eppendorfgefäße wurde jeweils 26µl steriles Wasser vorgelegt, ausserdem eine Negativkontrolle, die nur Wasser enthielt. Jeweils 1µl der cDNA wurde zugefügt und gut gemischt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch erstellt, bestehend aus gleichen Mengen von dNTPs, 10×Reaktionspuffer +MgCl₂, äquimolaren Mengen der komplementären Primer, α(³³P)dCTP und der *Taq*-Polymerase. Das radioaktiv markierte Nukleotid wurde zusammen mit dem Enzym zum Schluss beigelegt.

Zu einem Gesamtreaktionsvolumen von 50µl wurde das Reaktionsgemisch den Proben beigefügt, zentrifugiert, die Eppendorfgefäße in den vorgeheizten Thermocycler gegeben und das Reaktionsprogramm gestartet. Anschließend wurden die PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese auf einem 6% PAA-Gel bei 125V aufgetrennt.

Das Gel wurde in einem Vakuumgeltrockner 2h getrocknet und für die Bandendetektion zwei Tage ein Röntgenfilm aufgelegt.

Dieses Verfahren wurde angewandt, um die Transkription von neuroendokrinen Markern, verschiedener Integrine, einiger Transkriptionsfaktoren und weiterer Gene zu untersuchen.

6.4. Bandshift-Analyse

Um DNA-Protein-Interaktionen nachzuweisen, wurden Bandshift-Analysen durchgeführt. Das Prinzip dieser Methode besteht darin, dass ein spezifisches radioaktiv markiertes DNA-Segment mit Proteinextrakt inkubiert wird und die entstandenen Protein-DNA-Komplexe mittels einer PAA-Gelelektrophorese analysiert werden. Durch Proteine, die spezifisch an das eingesetzte Oligonukleotid binden, ergeben sich nach Autoradiographie zwei Banden unterschiedlicher Laufgeschwindigkeit. Die weiter gelaufene Bande entsteht durch das Oligonukleotid selber. An selbiges gebundene Proteine haben retardierende Auswirkungen auf die Laufgeschwindigkeit des Oligonukleotids, so dass es zu einem sogenannten Bandshift kommt, und eine zweite Bande mit geringerer Laufweite entsteht. Deren Intensität ist abhängig von der Menge des bindenden Proteins. Diese Methode wird eingesetzt zur Untersuchung von Transkriptionsfaktoren, wie z.B. NFκB, und anderer DNA-Bindeproteine.

Das beschriebene Protokoll wurde 1986 von Singh entwickelt.

Zunächst werden Proteinextrakte der Zellen hergestellt, die das zu untersuchende Protein synthetisieren. Dabei ist zu beachten, in welchem Zellkompartiment das Protein vorhanden ist, und danach zu entscheiden, ob Gesamtproteinextrakt, Kernproteinextrakt oder zytoplasmatische Proteine benötigt werden. In diesem Fall befinden sich das untersuchte Protein NFκB in seiner aktiven Form im Zellkern.

Tabelle 10: Einzelschritte der Bandshift-Analyse

- Präparationen von Kernextrakten in hochkonzentrierten Salzlösungen
- Konzentrationsbestimmung nach Lowry
- Hybridisierung der einsträngigen Oligonukleotide
- Radioaktive Markierung der Doppelstrang-Oligonukleotide
- Eigentliches Bandshift-Experiment
 - Inkubation des Kernextrakts mit markiertem Oligonukleotid
 - PAA-Gelelektrophorese
 - Autoradiogramm

6.4.2. Präparation von Kernextrakten in hochkonzentrierten Salzlösungen

Für Gelretardationsexperimente wurden Kernextrakte von sieben Zelllinien hergestellt. Die Vorgehensweise wird für adhärent wachsende und Suspensionszellen im Folgenden beschrieben:

Vorbereitend wurden die Zellen für 24 h in serumfreiem Medium gehalten.

Bei den adhärent wachsenden Zellen wurde das Medium aus der 250 ml Gewebekulturflasche abgesaugt und der Zellrasen mit PBS gewaschen.

Dann wurden die Zellen zunächst in 1 ml PBS mit einem Zellschaber abgelöst und die Kulturflasche mit 0,5 ml PBS nachgespült. Die Zellsuspension wurde in ein 2ml Eppendorfgefäß überführt und 15 sec bei 13000 UpM und Raumtemperatur in einer Eppendorftischzentrifuge zentrifugiert.

Die Suspensionszellen wurden mitsamt des Mediums in ein 50 ml Falcongefäß überführt und 5 min bei 800 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und dem Zellpellet 5 ml PBS zugesetzt. Nach gründlichem Mischen wurde wiederum für 5 min bei 800 UpM zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert und die Lösung in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt.

Auch hier erfolgte eine 15 sec Zentrifugation bei 13000 UpM und Raumtemperatur in einer Eppendorftischzentrifuge.

Der Überstand wurde jeweils verworfen und die Zellen in 600µl Niedrigsalzpuffer (s. Materialien) resuspendiert. Nach zehn Minuten Inkubation auf Eis wurden die Zellen gevortext und heftig aufgeschüttelt, um anschließend für zehn Sekunden unter obigen Bedingungen zentrifugiert zu werden. Der Überstand wurde verworfen und die unter den hypotonen Umständen geschwellenen Zellen wurden je nach Menge in 50–200µl Hochsalzpuffer

(s. Materialien) aufgenommen. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurde die Suspension wiederum kurz gevortext und anschließend zwei Minuten bei 13000 UpM und 4°C in einer Eppendorftischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand, der die Kernproteine enthielt, wurde bei –80°C eingefroren. DTT und PMSF wurden jeweils kurz vor Gebrauch zugesetzt.

6.4.3. Hybridisierung synthetischer Oligonukleotide

Äquimolare Mengen an komplementären, synthetischen Oligonukleotiden (je 7µg) wurden in einem Gesamtvolumen von 30µl mit 10mM Tris/HCl; 1mM EDTA, 30mM NaCl, pH 8.8 für 1,3 min bei 65°C inkubiert und danach langsam auf 20°C abgekühlt. Anschließend erfolgte eine Reinigung der Oligonukleotide über NAP 10-Säulen von pharmacia entsprechend des Herstellerprotokolls, um die Doppelstrangoligonukleotide von den Einstrangfragmenten zu trennen. Die gereinigten doppelsträngigen Oligonukleotide wurden bis zum weiteren Gebrauch bei –20°C gelagert.

6.4.4. Markierung der Oligonukleotide

Bei der radioaktiven Markierung der Oligonukleotide wurde nach verschiedenen Protokollen vorgegangen. Oligonukleotide mit glatten Enden wurden mit Hilfe der T4-Kinase markiert, die NFκB-Oligonukleotide mit überhängenden Enden wurden mit dem Klenowfragment der DNA-Polymerase 1 von Boehringer, Mannheim markiert.

Die T4-Kinase ist ein Enzym mit 5'-Polynukleotid-Kinase und 3'-Phosphatase-Aktivität und katalysiert die Bindung von γ Phosphat-ATP an die 5'-Hydroxy-Gruppe von DNA oder RNA.

Mit Hilfe des Klenowfragments wird die Anlagerung radioaktiv markierter Nukleotide an die überhängenden Enden der Doppelstrangoligonukleotide katalysiert.

5.4.4.1. Markierung von blunt end –Oligonukleotiden mit T4-Kinase

Je 20ng Oligonukleotide wurden mit 5µl 5×Forward Reaction Buffer, 2.5µl $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (10µCi/µl) und 10 U T4-Polynukleotid-Kinase in einem Gesamtvolumen von 25µl nach kurzer Zentrifugation für 10min bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Reaktion mit 1µl EDTA(5mM) gestoppt.

5.4.4.2. Markierung von sticky-end-Oligonukleotiden mit dem Klenowfragment

Je 20ng doppelsträngiges Oligonukleotid mit überhängenden Enden wurde in einem Volumen von 20µl mit Restriktionspuffer B von Boehringer, Mannheim und je 0.125 nM dATP, dGTP, dTTP sowie ca 30 µCi (α - ^{32}P) dCTP mit dem Klenowfragment der DNA-Polymerase 1 von Boehringer, Mannheim für 25min bei Raumtemperatur markiert.

6.4.5. Reinigung der markierten Oligonukleotide

Um die markierten Oligonukleotide von den restlichen unmarkierten Nukleotiden zu trennen, wurde zunächst eine Phenol-Chloroform-Reinigung durchgeführt und anschließend über eine G-50 Micro Column von Amersham Pharmacia Biotech gereinigt. Dazu wurden jeweils 100µl Phenol und Chloroform zu den markierten Oligonukleotiden gegeben, gevortext und 2min bei 8000Upm zentrifugiert. Im Reaktionsgefäß wurde eine Phasentrennung beobachtet, wobei die untere Phenol-Chloroform-Phase die zu trennenden Reaktionsbestandteile, wie Puffer, Enzyme etc. enthielt. Die obere wässrige Phase, welche die DNA enthielt, wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Nach Zugabe von 200µl Chloroform wurde erneut geschüttelt und zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß gegeben. Diese vorgereinigte DNA wurde nun über Sephadex-G-50-Säulen von Amersham Pharmacia nach Herstellerangaben gereinigt. Anschließend wurde die DNA-Lösung auf eine Konzentration von 20000cpm/µl eingestellt.

6.4.6. Gelretardationsanalyse

Um DNA-Protein-Interaktionen nachzuweisen, wurden Gelretardationsexperimente durchgeführt (Fried und Crothers, 1981; Garner und Revzin, 1986). Je 2µg Zellkernextrakt wurden zusammen mit 5×Reaktionspuffer BSB, BSA, poly dIdC und 1M KCl in einem Gesamtvolumen von 24µl für zehn Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 20000cpm markierter DNA wurde die Inkubation für 20min in einem Volumen von 25µl fortgesetzt. Um sicher zu stellen, dass die nachgewiesene Protein-DNA-Interaktion spezifisch ist, wurde eine Kontrolle mit unmarkiertem Oligonukleotid im Überschuss zusätzlich zur markierten DNA mitgeführt. Bei spezifischer Bindung an das Oligonukleotid war eine schwächere Bandshift-Bande zu erwarten, da das Protein zu größerer Menge mit dem im Überschuss vorhandenen unmarkierten Oligonukleotid interagieren würde.

Die Auftrennung erfolgte in einem 4% PAA-Gel bei 140V. Nach Trocknen des Gels in einem Vakuumtrockner wurde ein Autoradiogramm angefertigt.

7. Ergebnisse

Im Rahmen des Projektes soll untersucht werden, ob es sich bei dem beobachteten Phänomen der spontanen Adhärenz von SCLC-Zellen um ein ähnliches Ereignis wie bei der Variantenentstehung *in vivo* handelt. Die Mechanismen der spontanen Variantenentstehung sind bislang unerforscht, und die beschriebenen Beobachtungen sollen zur Aufklärung der Therapieresistenz von SCLC-Rediziven beitragen. Einen Richtung wiesen die Nachforschungen von Sethi et al., der Adhärenz und Chemoresistenz miteinander in Zusammenhang brachte über eine integrinvermittelte Tyrosinkinaseaktivierung. Eine Beteiligung der Kinase AKT ließ sich nach den ersten Experimenten der Arbeitsgruppe vermuten, da in den adhärenenten Zellen konstitutiv aktiviertes AKT gefunden wurde.

7.1.1. Methodik

Gegenstand der Untersuchung sind die drei SCLC-Linien NCI-H69, NCI-N592 und NCI-H82, von denen jeweils die ursprüngliche Suspensionsform mit der neu etablierten adhärenenten Form bezüglich verschiedener Eigenschaften verglichen wird. Im Vordergrund stehen hierbei der Vergleich der PKB-Phosphorylierung sowie die Untersuchung diverser Komponenten des AKT-Signalwegs auf Gen- und Proteinebene. Da von der Zelllinie H69 aus früheren Experimenten verschiedene transfizierte Subklone zur Verfügung standen, von denen ebenfalls Suspensionsformen und adhärenente Formen existierten, wurden diese in die Western-Blot-Analysen und RT-PCR einbezogen.

Zunächst wurde bestätigt, dass die adhärenenten SCLC-Klone typische vSCLC-Eigenschaften aufweisen. Variante SCLC sind charakterisiert durch den Verlust ihrer typischen neuroendokrinen Kleinzellmarker und eine erhöhte Therapieresistenz. Western-Blot-Analysen ergaben eine verstärkte PKB-Phosphorylierung in den adhärenenten Zellen.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurden systematisch Komponenten des AKT-Signalwegs untersucht, sowohl auf Genexpressions- als auch auf Proteinebene. Dies beinhaltete Komponenten der BCL2-Familie mit Schwerpunkt auf BAD, dessen apoptosefördernde Wirkung durch AKT inhibiert wird. Ein weiterer Gegenstand der

Untersuchung stellte der Transkriptionsfaktor NF κ B dar, welcher von AKT aktiviert wird.

Es wurde die NF κ B-Expression mittels RT-PCR dargestellt und durch Bandshiftanalysen seine Aktivität als Transkriptionsfaktor ermittelt. Auch einige Apoptoseschutz-Gene, deren Transkription von NF κ B gefördert wird, wurden hingehend ihrer Expression untersucht.

Als Nebenaspekt wurde die MAPK-Aktivierung in den drei SCLC-Linien und ihren adhärenen Varianten betrachtet, die als wichtiges Element an Differenzierungsvorgängen und maligner Transformation beteiligt ist.

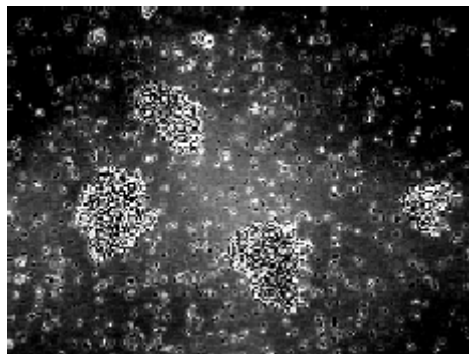
Ein Schwerpunkt bestand in der Ergründung, ob sich AKT-Expression und Adhärenz gegenseitig bedingen, und ob der Apoptoseschutz ein reversibler Vorgang ist, der sich durch Aufhebung der Adhärenz rückgängig machen lässt. Um dieser Frage nachzugehen, wurden die Zelllinien auf ihre Expression von Integrinen untersucht, basierend auf den Erkenntnissen von Sethi et al., der Resistenz mit der verstärkten Expression des β 1-Integrins in Zusammenhang bringt. Desweiteren wurden Zellkulturexperimente zum Aufheben der Adhärenz vorgenommen und ihre Auswirkung auf die AKT-Expression untersucht.

7.1.2. Spontane Adhärenz korreliert mit Verlust neuronaler Differenzierungsmarker

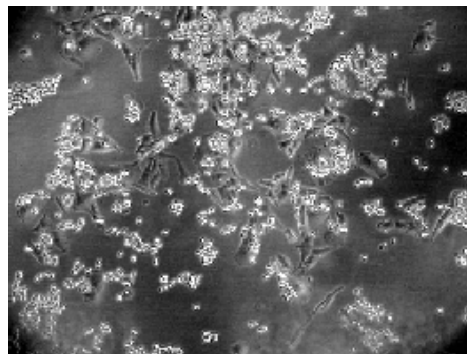
Die Photos der folgenden Seite zeigen die drei untersuchten SCLC-Zelllinien NCI-H69, N592 und NCH-H82 sowie ihre adhärenen Varianten. Die Suspensionszellen wachsen in frei schwimmenden Aggregaten zu mehreren hundert Zellen und haben ein rundliches Aussehen. Die als variant beschriebene Linie NCH-H82 wurde aus einem Tumor mit varianten Anteilen etabliert. Sie proliferiert schneller und bildet in Suspension kleinere Aggregate als die klassischen SCLC NCI-H69 und N592. Auch von dieser ursprünglich varianten Linie ließ sich eine adhärenente Variante züchten.

Die adhärenen Klone weisen eine epitheliale Morphologie auf. Sie wachsen in Form eines Monolayers auf L-Lysin-beschichteten Flaschen und bilden spindelförmige Ausläufer.

Abbildung 12 : Fotos der Zelllinie N592



Das Foto zeigt die Suspensionsform der Zelllinien N592. Die Zellen wachsen in dicht gepackten Aggregaten freischwimmend im Medium



Auf dem Foto ist die adhäre Form der Linie N592 zu sehen. Die Zellen haben epithelartige Ausläufer und wachsen in Form eines Monolayers.

7.1.3. Adhäre Zellen zeigen Charakteristika undifferenzierter Nichtkleinzeller

6.1.3.1. Verlust der neuroendokrinen Marker

Für die SCLC-Linie NCI-H69 und ihre adhäre Variante H69ad konnte im Vorfeld mittels RT-PCR bestätigt werden, dass die adhären Klone ihre typischen SCLC-Marker verlieren. Die Expression an L-Dopa-Decarboxylase, NSE (Neuron specific enolase) und Chromogranin A sind signifikant schwächer als bei den Suspensionszellen. Diese Vorarbeiten wurden ausgeweitet auf die Linien N592 und NCI-H82 sowie einige weitere NSCLC- Linien als Kontrollen.

L-Dopa-Decarboxylase wird von allen Suspensionsklonen stark expremiert, außer von der varianten Suspensionslinie H82sus. Besonders starke Ausprägung an L-Dopadecarboxylase zeigen H69sus und N592sus, sowie zwei Subklone der Linie H69sus. Alle adhären Klone expremieren das Enzym schwächer bzw. gar nicht. Bei drei transfizierten Subklonen der Linie H69ad sowie bei N592ad findet sich keine Enzymexpression unter den verwendeten PCR-Bedingungen.

Auch beim neuroendokrinen Marker Chromogranin A zeigen sich deutliche Genexpressionsunterschiede zwischen Suspensionszellen und adhären Zellen. Der Marker wird von allen Suspensionszellen stark expremiert; eingeschlossen ist die varianten Zelllinie H82sus.

Von allen adhärenenten Klonen wird Chromogranin A schwächer expremiert, außer von einem transfizierten adhärenenten Subklon der Linie H69ad. N592sus und ad zeigen nur geringfügig differente Expressionen an Chromogranin A.

Von den untersuchten NSCL-Zelllinien expremiert keine Chromogranin A.

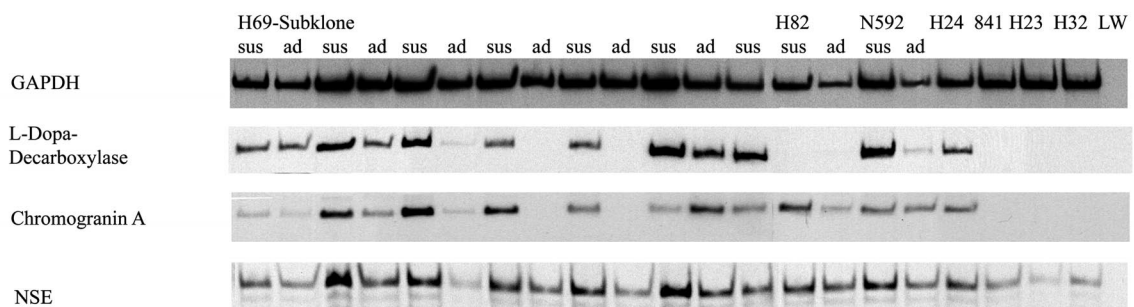
Beim klinisch als Tumormarker für das SCLC eingesetzte NSE finden sich bei geringer PCR-Zyklenzahl den obigen Ergebnissen vergleichbare Expressionsunterschiede. Das Enzym wird von H69ad sowie einigen adhärenenten Subklonen und von N592ad geringfügig schwächer expremiert als vom entsprechenden Suspensionsklon, jedoch sind die Ergebnisse nicht vergleichbar eindrucksvoll wie obig beschriebene Expressionsunterschiede von L-Dopa-Decarboxylase und Chromogranin A.

Die folgende Tabelle enthält die Zusammenfassung der beschriebenen Versuche.

Tabelle 11: Neuroendokrine Marker in Lungentumoren

- ◆ Die klassischen SCLC-Linien H69 und N592 expremieren neuroendokrine Marker.
- ◆ Entsprechende adhärenente Klone verlieren neuroendokrine Marker.
- ◆ Die vSCLC-Linie H82 expremiert kaum neuroendokrine Marker.
- ◆ NSCLC expremieren keine neuroendokrinen Marker.

Abbildung 13: RT-PCR Neuroendokrine Marker



Die Grafik zeigt die Expression der neuroendokrinen Marker L-Dopa-Decarboxylase, Chromogranin A und NSE in verschiedenen SCLC-Linien in Suspensionsform (sus) und ihren adhärenenten Varianten (ad). Als Kontrolle dient die Expression der Housekeeping-Gens GAPDH.

Die Zelllinien H841, H23 und H32 wurden als NSCLC-Kontrollen getestet. Außerdem diente ein Leerwert zur Sicherstellung der PCR-Reinheit.

Es fällt auf, dass die meisten adhärenenten Varianten ihre neuroendokrinen Marker verlieren.

Tabelle 12: PCR-Ergebnisse Neuroendokrine Marker

GEN	BP	PCR-BED.	H69-SUBKLONE														
			sus	ad	sus	ad	sus	ad	sus	ad	sus	ad	sus	ad	sus	ad	sus
GAPDH	299	58°/20	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
NSE	159	54°/28	**	*	***	**	**	(*)	**	*	***	**	***	**	***	**	**
L-Dopa-Decarboxylase	219	61°/27	**	**	***	**	***		**		**		***	**	***	**	***
Chromogranin A	222	63°/30	(*)	(*)	***	*	***	*	***		**		*	**	*		*

GEN	BP	PCR-BED.	N592		H82		H24	H841	H103	H23	H32
			sus	ad	sus	ad					
GAPDH	299	58°/20	***	***	***	***	***	***	***	***	***
NSE	159	54°/28	**	*	**	**	**	*	k.A.	(*)	*
L-Dopa-Decarboxylase	219	61°/27	***	(*)			**		k.A.		
Chromogranin A	222	63°/30	**	**	***	*	**		k.A.		

7.1.4. Adhärenz Klone sind resistenter gegenüber Zytostatika

Resistenzversuche mit verschiedenen Chemotherapeutika wurden von der Arbeitsgruppe durchgeführt, und sollen hier im Rahmen des Gesamtkontextes Beachtung finden.

Die drei zu untersuchenden SCLC-Paare sowie die großzellige Zelllinie H103 wurden steigenden Dosen verschiedener Zytostatika ausgesetzt und die überlebenden Zellen gezählt.

Signifikante Resistenzen der adhärenz Zellen ergeben sich gegenüber Etoposid und Cyclophosphamid. Bezüglich Doxorubicin, Taxol und Cisplatin zeigen sich die varianten Zellen nicht widerstandsfähiger als die entsprechenden Suspensionszellen.

Die großzellige Kontrolllinie erweist sich vergleichbar chemoresistent mit den adhärenen Klonen. Diese Beobachtung entspricht den bekannten Eigenschaften von NSCLC-Zellen.

Entgegen den Erwartungen zeigt die ursprünglich variante Linie H82sus keine signifikant höhere Resistenz als die klassischen Suspensionszellen. Unter Etoposid ist der Zellverlust bei H82 sogar größer als bei den klassischen Linien H69 und N592.

Die deutlichsten Unterschiede in den Resistenzen zwischen Suspensionszellen und entsprechenden adhärenen Zellen zeigt die Linie N592. Bei 1e^{-5} -molarer Cyclophosphamidkonzentration unterscheiden sich die Überlebensraten um 40%. Von den adhärenen Zellen leben bei dieser Dosis noch nahezu alle Zellen, gegenüber 60% vitaler Suspensionszellen. Vergleichend findet sich bei H69 ein Unterschied von nur 20% bei gleicher Dosis. Dieser Effekt kann allerdings auch durch die allgemein als etwas höher geltende Resistenz der H69sus bedingt sein und nicht nur durch die Überlegenheit der adhärenen Linien.

7.1.5. Apoptoseverhalten der adhärenen Zellen bei Bestrahlung

Innerhalb der Arbeitsgruppe wurden Bestrahlungsversuche und anschließende Hoechst-Färbungen zur Identifikation apoptotischer Zellen durchgeführt. Dadurch wurde der Fragestellung nachgegangen, ob sich die adhärenen Varianten der drei SCLC-Linien gegenüber Bestrahlung unterschiedlich verhalten als die klassischen Kleinzeller.

Das Experiment sieht eine Bestrahlung der drei Kleinzeller im Vergleich von Suspensionsform zu adhärenen Form mit 2 Gy oder 8Gy vor. Jeweils eine nichtbestrahlte Kultur der untersuchten Zellen dient als Kontrolle. Die allgemein als resistent gegenüber Radiotherapie einzustufende großzellige Linie H103 wird ebenfalls als Kontrolle mitgeführt. Drei Tage nach der Behandlung werden Hoechst-Färbungen zur Darstellung apoptotischer Zellen vorgenommen und diese ausgezählt. Der Vergleich erfolgt anhand der prozentualen Apoptoseraten bei Suspensionszellen und den entsprechenden adhärenen Varianten. Alle Versuche werden dreimal durchgeführt.

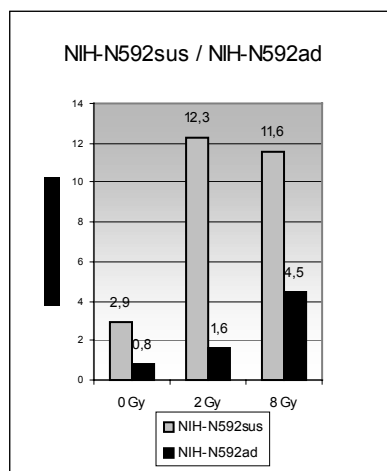
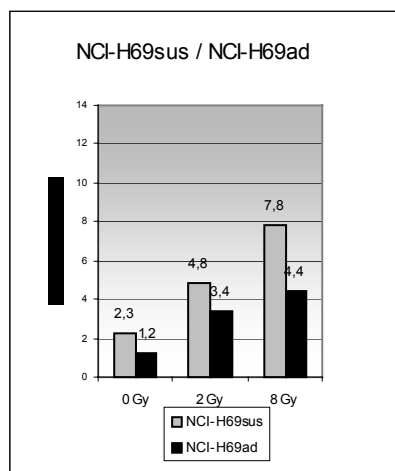
Es zeigt sich ein deutlich unterschiedliches Apoptoseverhalten bei allen adhärennten Zelllinien im Vergleich zu ihren Suspensionsklonen, insofern, als dass bei den adhärennten Zellen durch Bestrahlung seltener bzw. erst bei höheren Dosen die Apoptose induziert wird.

Dieser Effekt ist bei der Linie N592 am deutlichsten ausgeprägt. Hier beträgt die Apoptoserate unter 2Gy 12.3% bei Suspensionszellen und nur 1.6% bei adhärennten Zellen. Ähnliche Effekte zeigen sich auch unter 8Gy. Bei den beiden anderen SCLC-Zelllinien weisen die Ergebnisse in dieselbe Richtung, sind aber insgesamt etwas schwächer ausgeprägt.

Auch in den nicht bestrahlten Kontrollen lassen sich wenige apoptotische Zellen darstellen, was durch die Neigung der Zellen zu stressinduzierter Apoptose unter den vorherrschenden serumfreien Bedingungen erklärt wird. Außerdem finden sich physiologischerweise in jedem Zellverband einige apoptotische Zellen.

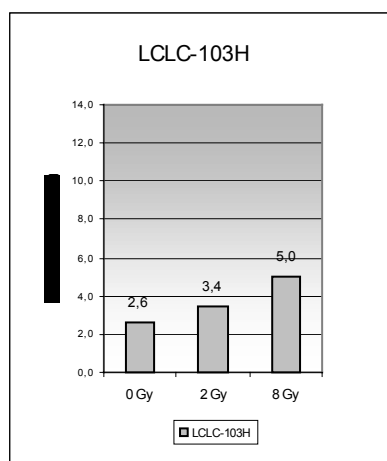
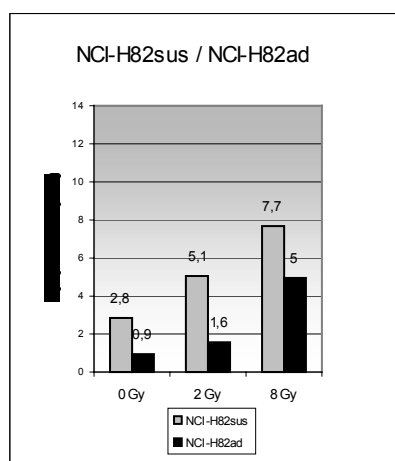
Die Versuchsergebnisse sind in Abbildung 15 dargestellt.

Abbildung 14: Apoptoserate von Kleinzellern unter Bestrahlung



Die vier gezeigten Diagramme zeigen die prozentualen Apoptoseraten der Zelllinien H69, N592, H82 und H103.

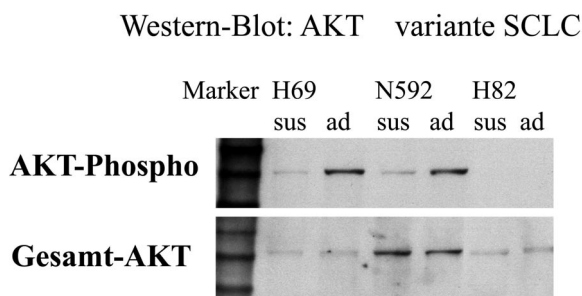
Die Identifizierung der apoptotischen Zellen erfolgte mittels Hoechst-Färbung. Die Messung fand am dritten Tag nach Bestrahlung statt.



7.1.6. AKT-Expression in varianten kleinzelligen Bronchialkarzinomen

Mittels Western-Blot-Analysen wurden die drei SCLC-Paare auf ihre konstitutionelle AKT-Phosphorylierung untersucht. Dafür wurde den Zellen vor der Proteinextraktion 24h das Serum entzogen, um die Aktivierung von AKT durch Wachstumsfaktoren zu unterbinden. Die ersten Western-Blots wurden mit einer im Antikörperkit enthaltenen Positiv-Kontrolle versehen, später diente die Zelllinie H69ad als Positivkontrolle für AKT-P (phosphoryliertes AKT). Als weitere Kontrolle wurde jede Membran ebenfalls mit einem Gesamt-AKT-Antikörper inkubiert, um den Anteil von phosphoryliertem

Abbildung 15: kontaktvermittelte AKT-Aktivität



AKT am Gesamt-AKT der Zelle

darzustellen.

Abbildung 15 zeigt einen Western-Blot gegen aktiviertes AKT (oben) und Gesamt-AKT (unten) im Vergleich zwischen den drei untersuchten SCLC-Paare H69, N592 und H82.

Abbildung 16: AKT-Aktivität in H69-Subklonen

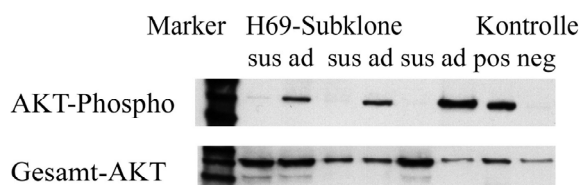


Abbildung 16 zeigt die AKT-Phosphorylierung in einigen H69-Subklonen. Als Kontrolle diente die im Antikörperkit enthaltene Positivkontrolle. In späteren Western-Blots wurde Protein der Zelllinien H69ad als Positivkontrolle verwendet, da dieser Zelltyp ein hohes Ausmaß an AKT-Phosphorylierung zeigt, wie die starke schwarze Band bei H69ad in der Abbildung beweist. Im Western-Blot korreliert die Stärke der Bande mit dem Level am jeweils nachgewiesenen Protein.

Es fällt auf, dass die adhärenenten Klone der Linien H69 und N592 über eine starke AKT-Aktivierung verfügen, die den Suspensionszellen nahezu vollständig fehlt.

Die Zelllinie H82 zeigt keine AKT-Phosphorylierung weder im adhärenenten Subklon, noch als Suspensionsform bei nur geringgradig schwächerer Gesamt-AKT-Expression im Vergleich zu den anderen Zelllinien

Abbildung 17: AKT-Aktivität in NSCLC-Kontrollen

Western-Blot:AKT in H69 und NSCLC-Kontrollen

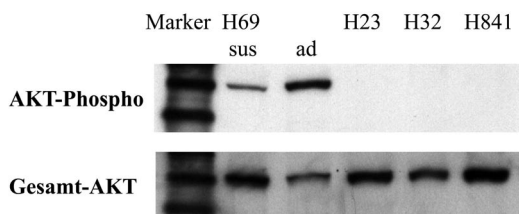


Abbildung 17 zeigt die AKT-Expression in einigen NSCLC-Kontrollen im Vergleich mit der SCLC-Zelllinie H69. Es fällt die starke AKT-Aktivität in der SCLC-Linie insbesondere in ihrer adhärenenten Subform auf.

7.1.7.MAPK-Aktivität in adhärenenten Varianten

Neben dem AKT-Signalweg wurde auch die MAPK-Expression in den drei SCLC-Paare mittels Western-Blot untersucht. Es stellen sich die beiden MAPK-Unterformen als Doppelbande mit dem jeweiligen Molekulargewicht von 42 und 44 kDa dar. Neben diesem Hauptaspekt wurden wiederum mehrere Subklone der Zelllinie H69 in Suspensionsform und adhärenenten Form sowie mehrere NSCLC-Kontrollen untersucht. Die Ergebnisse zeigen die folgenden Abbildungen.

Alle adhärenenten Klone weisen eine starke MAPK-Aktivierung auf, die jedoch bei H82ad nur die Hälfte der anderen adhärenenten Klone ausmacht. Die Suspensionsklone zeigen insgesamt eine schwache MAPK-Aktivität. N592sus weist keine MAPK-Phosphorylierung auf. Als Kontrolle diente zunächst die im Antikörperkit enthaltene Positivkontrolle, später wurde Protein der Linie H69ad eingesetzt. Auch hier wurde die Membran später zusätzlich mit einem Antikörper gegen Gesamt-MAPK inkubiert. Dabei zeigt sich eine starke MAPK-Expression in allen untersuchten Zelllinien. Bei den NSCLC-Kontrollen fand sich ein geringeres Maß an MAPK-Aktivität.

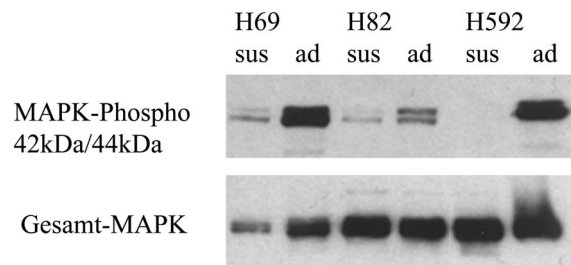
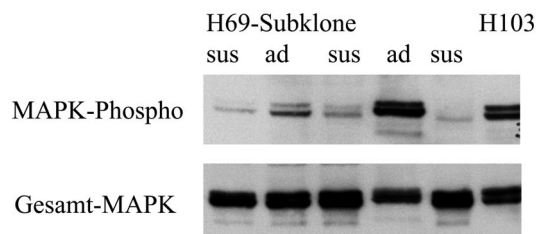
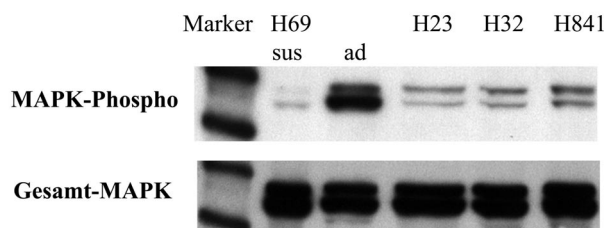
Abbildung 18: MAPK-Aktivität bei varianten SCLC

Abbildung 18 zeigt die MAPK-Aktivität in SCLC-Zelllinien. Es fällt auf, dass alle Linien einen hohen Gehalt an MAPK haben (Foto unten), jedoch ist die Aktivität (MAPK-Phospho) in den adhärenen Varianten wesentlich höher.

Abbildung 19: MAPK-Aktivität in H69-Subklonen**Western-Blot MAPK**

Die Abbildung zeigt die MAPK-Aktivität (MAPK-Phospho), sowie den MAPK-Gesamtgehalt in H69-Subklonen und der großzelligen Linie H103. Es fällt auf, dass die adhärenen Klone der Zelllinie H69 stärkere MAPK-Aktivität aufweisen als die anderen Zellen. Der MAPK-Gesamtgehalt ist bei allen untersuchten Zelllinien hoch.

Abbildung 20: MAPK-Aktivität in NSCLC**Western-Blot: MAPK-Aktivität**

Die nebenstehende Abbildung zeigt die MAPK-Aktivität in NSCLC-Linien im Vergleich zur Zelllinie H69. Die adhärenente Variante der Linie H69 weist deutlich mehr MAPK-Aktivität auf als die Suspensionsform und als die NSCLC-Zellen.

7.2.AKT-gesteuerte Signalwege

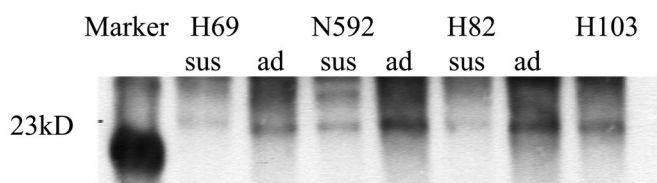
7.2.1.BAD-Phosphorylierung in adhärenenten Klonen

In den drei zu vergleichenden Kleinzellerlinien samt ihrer adhärenenten Subklone wurde mittels Western-Blot-Analyse der Level an BAD-Phosphorylierung untersucht. Als Kontrolle diente die großzelllige Linie H103. Zunächst erfolgte eine Vorkonzentration des Proteins mittels Immunpräzitation mit einem BAD-Antikörper. Als Kontrolle für die Spezifität des BAD-Antikörpers wurde eine für BAD positive Zelllinie anstattdessen mit einem Anti Rabbit IgG-Antikörper vorbehandelt. Auf dem Film zeigt sich hierbei keine Bande. Anschließend erfolgte mit dem vorkonzentrierten BAD-Protein eine Western-Blot-Analyse mit einem Antikörper gegen phosphoryliertes BAD.

Es zeigt sich bei allen adhärenenten Klonen der drei SCLC-Linien eine verstärkte BAD-Phosphorylierung, was mit der verstärkten AKT-Expression in diesen Zellen korreliert. Besonders anzumerken ist, dass sich auch bei der Linie H82ad, bei der keine vergleichbar hohe AKT-Aktivität besteht, eine hohe BAD-Phosphorylierung nachweisen lässt. Die BAD-Phosphorylierung in der großzelligen Kontrolle liegt zwischen Suspensionsklonen und adhärenenten Klonen der SCLC. Die stärkste BAD-Phosphorylierung weisen die Linien N592ad und H82ad auf, wogegen H69ad etwas schwächer ausgeprägt ist, jedoch wesentlich stärker als H69sus.

Abbildung 21: BAD-Phosphorylierung

Western-Blot: Bad-Phospho



Die Abbildung zeigt BAD-Phosphorylierung in drei SCLC-Paaren im Western-Blot. Das verwendete Protein wurde zunächst durch Immunpräzitation mit einem BAD-Antikörper vorkonzentriert, um den phosphorylierten Anteil nachzuweisen. Auffällig ist eine verstärkte BAD-Phosphorylierung in den adhärenenten Klonen, die durch deren starke AKT-Aktivität erklärt wird.

7.2.2.Expression der BCL2-Mitglieder

Zusätzlich zur BAD-Phosphorylierung wurde die Transkription einiger Mitglieder der BCL2-Proteine in einer Serie von RT-PCR untersucht.

Darunter befanden sich BAD und BAX, BFL1, BCL2 und BCL-X_L. Unter den verwendeten PCR-Bedingungen lassen sich allerdings keine Tendenzen in der Genexpression erkennen. Insgesamt sind die Gene schwach expremiert mit Ausnahme von BAD. Bei der BAD-Expression fällt auf, dass die Mehrzahl der adhärenenten Zelllinien eine insgesamt schwächere Expression zeigt als ihre Suspensionspartner. Diese Tendenz ist besonders deutlich bei den Linien H82 und N592, weniger stark ausgeprägt bei der Linie H69 mitsamt ihrer transfizierten Subklone.

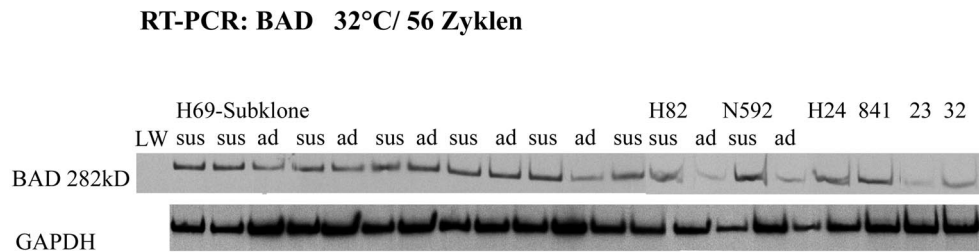
Tabelle 13: PCR-Ergebnisse BCL2-Proteine

GEN	BP	PCR-BED.	H69-SUBKLONE											
			sus	ad	sus	ad	sus	ad	sus	ad	sus	ad	sus	ad
GAPDH	299	58°/20 cyc.	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
BAD	282	56°/32	k.A.	k.A.	**	*	¹	**	*	**	***		***	
BAX	132	49°/30						(*)	*		(*)			
BCL2	174	53°/30		*										
BCL-X_L	245	58°/30												

GEN	BP	PCR-BED.	N592		H82		H24	H841	H103	H23	H32
			sus	ad	sus	ad					
GAPDH	299	58°/20	***	***	***	***	***	***	***	***	***
BAD	282	56°/32	*	***	***	***	*	*	*	**	***
BAX	132	49°/30									
BCL2	174	53°/30									
BCL-X_L	245	58°/30			**						

¹ leeres Feld = keine Expression

Abbildung 22: RT-PCR: BAD



Die Abbildung zeigt die BAD-Genexpression in den drei untersuchten SCLC-Linien H69, H82 und N592 sus, sowie ihrer adhärenen Varianten (ad), außerdem sind weitere SCLC (H24) und NSCLC-Linien gezeigt (H841, H23, H32). Die BAD-Expression ist in vielen adhärenen Klonen schwächer als in den Suspensionsklonen. Zum Vergleich ist die GAPDH-Expression (Strukturgen) der Zelllinien angeführt.

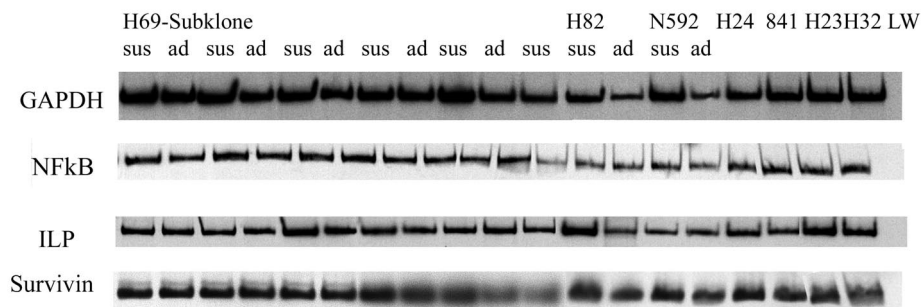
7.2.3. NFκB als transkriptioneller Aktivator antiapoptotischer Gene

Durch Phosphorylierung von IκKα ermöglicht AKT die Kernlokalisierung von NFκB und dessen Wirkung als Transkriptionsfaktor. Hier beeinflusst es die Transkription verschiedener antiapoptotischer Gene, so z.B. bIAP und cIAP (IAP= Inhibitor of Apoptosis), welche ubiquitär in sämtlichen Geweben als Apoptoseschutz fungieren. Demgegenüber übernimmt das NFκB abhängige Protein Survivin diese Aufgabe nur in Tumorzellen.

Neben diesen NFκB-abhängigen Proteinen wurde auch die NFκB-Expression selber in einer Serie von RT-PCR untersucht. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle und Abbildung dargestellt.

In allen Klonen findet sich eine gleich starke NFκB-Expression. Insbesondere zeigen sich keine Unterschiede zwischen Suspensionszellen und adhärenen Zellen. Survivin ist ebenfalls ausnahmslos in allen Zelllinien stark exprimiert. Kaum bzw. keine Expression zeigt sich bei cIAP, wogegen bIAP in nahezu allen Zellen mit

Abbildung 23: RT-PCR: NFκB und abhängige Gene

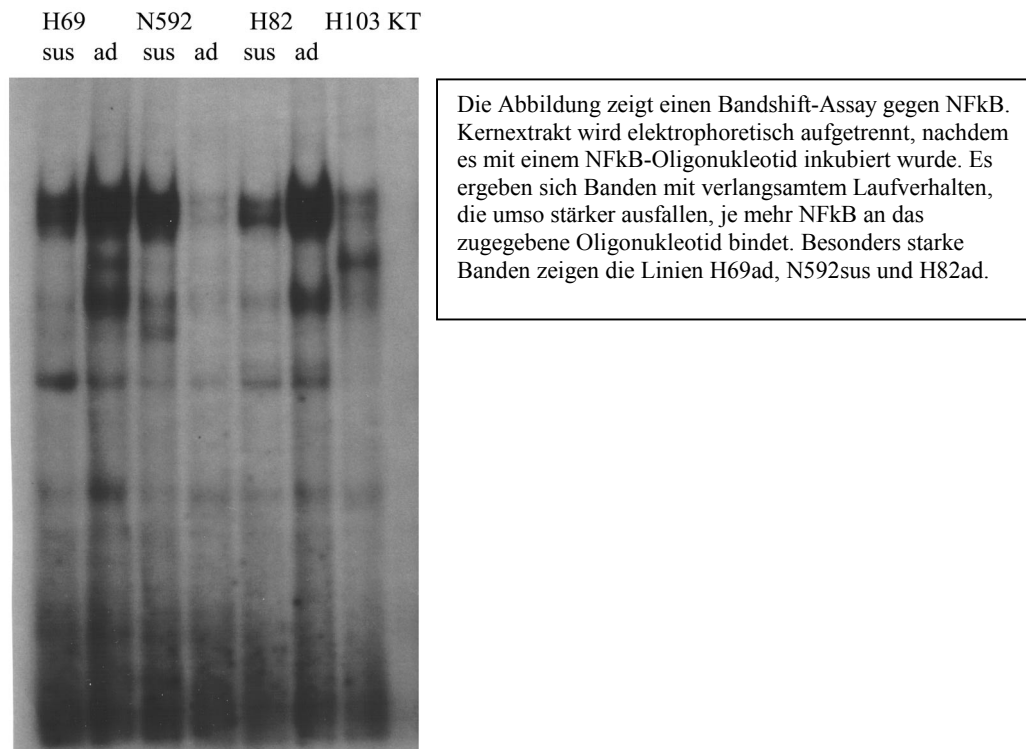


Die Abbildung zeigt die NFκB-Genexpression sowie die Expression der NFκB-abhängigen Gene ILP (Insulin like proteine) und Survivin. Als Vergleichspunkt ist das House-Keeping-Gen GAPDH dargestellt. Bei den untersuchten Genen zeigt sich durchgängig starke Expression ohne nennenswerte Unterschiede zwischen adhären Zellen und Suspensionszellen.

7.2.4.NFκB-Aktivität

Nachdem auf Genebene keine relevanten Expressionsunterschiede von NFκB bzw. abhängiger Proteine verzeichnet werden konnten, wurden Bandshiftanalysen durchgeführt. Die Expression der zurückbleibenden Bande in der Elektrophorese stellt ein Maß für die Protein-DNA-Interaktion dar, in diesem Falle für die Aktivität von NFκB als Transkriptionsfaktor. Bei den Zelllinien H69ad und H82sus und ad lassen sich Banden beschreiben, die ein langsames Laufverhalten zeigen, bei den anderen Linien finden sich keine derartigen Banden.

Abbildung 24: Bandshift NFkB



7.3. Akt-Aktivierung durch Adhärenz

Angeichts der Korrelation zwischen Adhärenz und AKT-Phosphorylierung in den varianten Zellen erhebt sich die Frage nach einem kausalen Zusammenhang. Dies sollte im Nachhinein untersucht werden, insbesondere unter Berücksichtigung der Integrinexpression in den adhären Zellen.

7.3.1. Integrinexpression

Mittels RT-PCR wurde die Expression der Integrinuntereinheiten

$\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 6$, $\beta 1$ und $\beta 4$ untersucht. Dabei zeigen sich bei einigen der Integrine signifikante Unterschiede zwischen adhärenen Kleinzellern und Suspensionsklonen insofern, als dass die adhärenen Klone einige Integrine stärker expremieren.

Dies ist der Fall bei den Integrinen $\alpha 2$ und insbesondere $\alpha 3$. Integrin $\alpha 3$ wird ausnahmslos von allen adhärenen Klonen stärker expremiert als von den entsprechenden Suspensionsklonen. Besonders deutlich sind die Unterschiede bei den Linien H82 sowie zwei Subklonen der Linie H69. $\alpha 2$ zeigt sich in sechs von acht adhärenen Klonen stärker ausgeprägt als in den passenden Suspensionszellen, besonders signifikante Unterschiede sind bei zwei Subklonen der Linie H69 zu beschreiben, sowie bei N592.

$\alpha 6$ wird von keiner Zelllinie expremiert, $\beta 4$ nur von der Linie N592ad. Bei der $\beta 1$ -Untereinheit manifestiert sich bei allen Zelllinien eine starke Expression ohne Unterschiede zwischen adhärenen Zellen und Suspensionszellen.

Abbildung 25: Integrinexpression in SCLC-Zellen

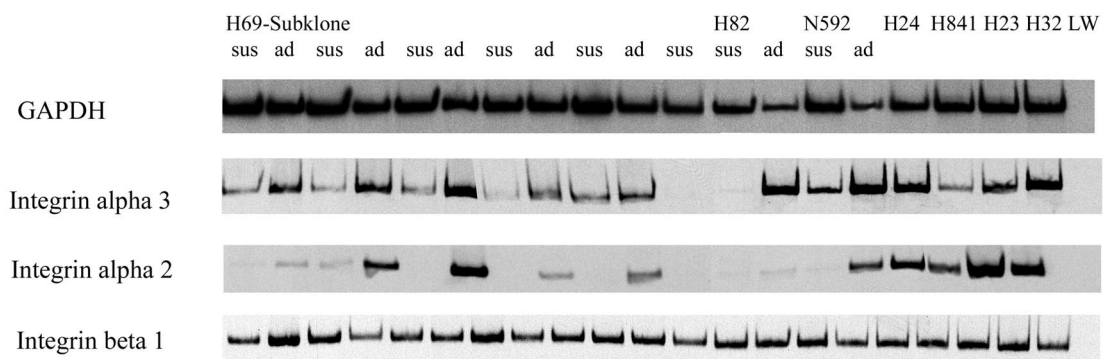


Tabelle 15: PCR-Ergebnisse Integrine

Gen	BP	PCR-BED.	H69-SUBKLONE										
			sus	ad	sus	ad	sus	ad	sus	ad	sus	ad	sus
GAPDH	299	58°/20	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
Integrin α2	242	56°/32		*	*	***		****		*		*	
Integrin α3	306	55°/32	*	**	*	**	*	**(*)	(*)	*	*	*(*)	
Integrin β1	239	52°/30	***	***	**	**	**	**	***	**	**	***	**
Integrin β4	466	56°/32					(*)						

Gen	BP	PCR-BED.	N592		H82		H24	H841	H103	H23	H32
			sus	ad	sus	ad					
GAPDH	299	58°/20	***	***	***	***	***	***	***	***	***
Integrin α2	242	56°/32		***			***	***	k.A.	****	***
Integrin α3				***	*(*)	***	***	*	k.A.	**	***
Integrin β1	239	52°/30	***	**	**	**	**	**	k.A.	**	**
Integrin β4	466	56°/32		**				(*)		(*)	**

7.4. Morphologische Transdifferenzierung

In Zellkulturexperimenten wurde nachgewiesen, dass die Umdifferenzierung der ursprünglichen Suspensionszellen zu adhären Zellen ein reversibler Vorgang ist.

Adhären Zellen der Linien H69ad, N592ad und H82ad verlieren auf unbeschichteten Zellkulturschalen, wie sie zur Bakterienkultur zur Verfügung stehen, nach wenigen Tagen ihren adhären Phänotyp und wachsen in freischwimmenden Aggregaten wie

die ursprüngliche Suspensionsform. Dieses Phänomen ist über vier Wochen beobachtet worden, ohne dass die Zellen abstarben.

Mittels Western-Blot-Analyse wurde die AKT-Phosphorylierung in den Zellen untersucht sowie die MAPK-Aktivität. Die Proteinextraktion erfolgte nach dem Standardprotokoll nach 24h unter serumfreien Bedingungen.

Bei den auf unbeschichteten Schalen wachsenden Zellen der Linien H69ad und N592ad lassen sich weder AKT-Aktivität noch MAPK-Aktivität nachweisen. Zum Vergleich sei wiederholt, dass diese Zelllinien auf L-Lysin-beschichteten Kulturflaschen eine epitheliale Differenzierung aufweisen und durch einen hohen Grad an AKT- und MAPK-Phosphorylierung charakterisiert sind.

Abbildung 26: AKT-Aktivität bei Kultur auf unbeschichteten Schalen

Western-Blot: AKT-Aktivität nach Aufhebung der Adhärenz

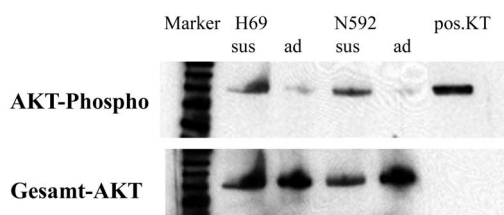
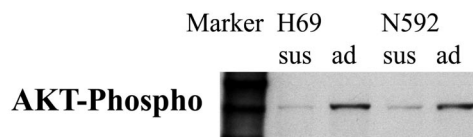


Abbildung 27: AKT-Aktivität auf Gewebekulturschalen

AKT-Aktivität unter Standardbedingungen



Die Abbildungen 26 und 27 zeigen die AKT-Aktivität auf unbeschichteten Kulturschalen (Abb.6) im Vergleich zu Standardbedingungen (Abb.7). Bei der Kultivierung auf unbeschichteten Platten verlieren die Zellen ihren adhären Phänotyp, was einhergeht mit einem geringeren Ausmaß an AKT-Phosphorylierung

8. Diskussion

Rasch einsetzende Therapieresistenz unter Chemo- oder Radiotherapie stellt für Patienten mit fortgeschrittenen kleinzelligen Bronchialkarzinomen das größte Problem im Hinblick auf eine Heilung dar. Zeigt der primär chemo- und radiosensible Tumor zunächst bei Bestrahlung oder Zytostatikatherapie eine gute Regression, so erweist sich das Rezidiv als sekundär resistent.

Dieses Resistenzverhalten korreliert mit dem Nachweis varianter Tumorzellen im Sektionsgut. Die Mechanismen der Differenzierung klassischer SCLC zu varianten Zellen, die ihre neuroendokrinen Marker verlieren und ein aggressiveres Verhalten gegenüber Bestrahlung und Chemotherapie zeigen, sind bislang nicht erforscht. Ein Grund dafür ist das Fehlen eines aussagekräftigen Zellkulturmodells, in dem die morphologischen und molekularen Vorgänge bei der Variantenentstehung beobachtet und entschlüsselt werden können.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit entstanden auf der Basis eines Zellkulturmodells, das sich aus den drei SCLC-Linien H69, N592 und H82 zusammensetzt. Neben den zwei klassischen Kleinzellerlinien H69 und N592, welche die typischen SCLC-Marker wie L-Dopa-Decarboxylase und NSE exprimieren, wurde auch eine aus varianten Tumoranteilen etablierte variante Linie H82 mitgeführt.

Von diesen drei Zelllinien konnten adhärente Varianten etabliert werden, bei denen ein Verlust der neuroendokrinen Marker und eine erhöhte Resistenz gegenüber Bestrahlung und Zytostatika zu verzeichnen ist, wie für variante SCLC charakteristisch. Mit Hilfe von Western-Blot-Analysen wurde eine starke Aktivität von AKT in den adhären Klonen der Linien H69 und N592 verifiziert. Dies korreliert mit einer deutlich erhöhten Resistenz gegenüber Etoposid und Cyclophosphamid wie auch gegenüber Gamma-Bestrahlung. Zudem findet sich in diesen Linien starke Expressionen der Integrinuntereinheiten $\alpha 2$ und $\beta 4$. Diese Ergebnisse liefern Hinweise auf eine Relevanz des AKT-Signalwegs in der Apoptosekontrolle der varianten Tumorzellen und einen Zusammenhang mit ihrem adhären Phänotyp.

8.1 Adhärenzte Zellen entsprechen varianten Zellen

Die Tatsache, dass das beobachtete Adhärenzverhalten der NCI-H69 und N592 mit einem Verlust der typischen neuroendokrinen Kleinzellmarker wie L-Dopa-Decarboxylase, Chromogranin A und NSE einhergeht, veranlasste Carney und Gazdar, diese Zellen als variante Kleinzeller zu bezeichnen [Carney et al., Gazdar et al. 85]. Gazdar beschreibt einen vollständigen Verlust von L-Dopa-Decarboxylase und eine geringere Konzentration von NSE in den varianten Zellen, was mit den Ergebnissen dieser Arbeit vereinbar ist.

Die adhärenzten Subklone der Zelllinien H69 und N592 verhalten sich gegenüber Bestrahlung und Chemotherapie resistenter als die entsprechenden Suspensionsklone. Diese Eigenschaft der adhärenzten Zellen entspricht der klinisch beobachteten Resistenz varianter SCLC im Gegensatz zu klassischen SCLC [Carney et al., Gazdar et al.]. Von anderen Arbeitsgruppen wurde *in vivo* eine Korrelation zwischen varianten Tumoranteilen und kürzerer Überlebenszeit der Patienten beschrieben, was ein indirekter Hinweis auf eine erhöhte Malignität und Resistenz der varianten Tumorzellen ist [Radice et al.; Hirsch et al.]. Von Goodwin et al. wurden 1982 ähnliche Beobachtungen an anderen Zelllinien gemacht wie im hier beschriebenen Zellkultursystem. Die SCLC-Linie OH-1 zeigt nach 16 Monaten in Kultur eine spontane Änderung ihrer Morphologie. Auffällig ist ihr vollständiger Verlust an L-Dopa-Decarboxylase. Nach Injektion in Nacktmäuse reagiert diese Variante auf Bestrahlung mit einer 100fach höheren Überlebensrate der Tumorzellen als die ursprüngliche Zelllinie. Eine molekularbiologische Erklärung für dieses Phänomen wurde zu diesem Zeitpunkt jedoch nicht gefunden.

8.2 Erhöhte Chemoresistenz korreliert mit AKT-Aktivität

Die adhärenenten Subklone der Zelllinien H69 und N592 weisen eine starke AKT-Phosphorylierung auf, die den Suspensionsklonen fehlt. Eine vergleichbar hohe Aktivität wurde bei keiner NSCLC-Linie festgestellt, die als Kontrolle bei den Western-Blot-Experimenten mitgeführt wurden. Der Gesamtgehalt an Proteinkinase B (AKT) war in allen Zelltypen ähnlich hoch. Das zeigt, dass ein Unterschied in der Aktivität des Enzyms zwischen den untersuchten klassischen Kleinzellern und den entsprechenden Varianten besteht.

AKT fungiert in der Zelle als Apoptoseinhibitor, so dass seine verstärkte Aktivität in den adhärenenten varianten Zellen eine Ursache für deren erhöhte Chemo- und Radioresistenz darstellen kann. Diese These wird unterstrichen durch die Tatsache, dass sich die Zelllinien H69ad und N592ad gegenüber Etoposid und Cyclophosphamid wesentlich resistenter erwiesen als die adhärenente Variante H82ad, welche keine konstitutionelle AKT-Aktivität zeigt. Aus der Literatur geht außerdem hervor, dass AKT in vielen Tumorarten überexprimiert oder dysreguliert ist, und dies mit einer besonders schlechten Prognose der Erkrankung korreliert [Khwaja et al., Cheng et al., Bellacosa et al.]. Eine mitogene, also gewissermaßen antiapoptotische Wirkung der Proteinkinase B auf SCLC-Zellen in Kultur wird ebenfalls beschrieben [Moore et al.]. Ein kausaler Beweis für die Verknüpfung von AKT-Aktivität und Resistenz der varianten Zellen könnte durch Ausweitung des beschriebenen Bakterienschalenversuchs erbracht werden.

Nach Ausschaltung der Adhärenz und AKT-Aktivität der Zellen sollten erneute Bestrahlungs- und Chemotherapieexperimente durchgeführt werden, um die rückdifferenzierten varianten Zellen auf verminderte Resistenz untersuchen zu können.

8.3 Wirkungen von AKT

8.3.1 NFκB-Aktivität durch AKT

Ein Weg der Apoptosekontrolle durch AKT besteht in der Aktivierung von NFκB, welches seine Funktion als Transkriptionsfaktor antiapoptotischer Gene ausübt. NFκB ist an seinen Inhibitor IκBα gebunden, von welchem es durch AKT gelöst wird und in seine aktive Form übergeht [Khwaja et al., Romashkova et al., Ozes et al.].

Auf RT-PCR-Ebene war NFκB in allen untersuchten Zelllinien gleichstark expremiert. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da wie zuvor beschrieben die NFκB-Aktivität nicht transkriptionell, sondern durch Bindung an seinen Inhibitor reguliert wird. Der aus diesem Grund durchgeführte Bandshiftassay ergibt verstärkte NFκB-Aktivität für die adhärenzte Variante der Linie H69. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Annahme, dass in den adhärenzten Zellen AKT seinen Apoptoseschutz unter anderem durch Aktivierung von NFκB und abhängigen Proteinen ausübt [Ozes et al., Romashkova et al.].

Von diesen NFκB regulierten Proteinen wurden für ILP, bIAP und Survivin deutliche Expressionszunahme in sämtlichen untersuchten Zelltypen nachgewiesen.

Unterschiede zwischen klassischen und varianten Kleinzellern waren nicht zu verzeichnen. Die Ursachen hierfür können zum einen technischer Natur sein, da unter den verwendeten PCR-Bedingungen durch eine zu hohe Zyklenzahl geringe Expressionsunterschiede nicht darstellbar sind. Zum anderen ist bekannt, dass Survivin allgemein in Tumorzellen stark expremiert ist.

8.3.2 AKT inaktiviert BAD

Durch Phosphorylierung an Ser136 wird das Apoptoseschutzprotein BAD von AKT inhibiert [Wang et al., Gajewski und Thomson, Datta et al., Khwaja et al.]. Dadurch überwiegt der antiapoptotische Effekt anderer Mitglieder der BCL2-Familie wie BCL-X_L und BCL2, und die Zelle ist geschützt gegen Apoptosestimuli wie beispielsweise Serumentzug, Chemotherapie oder Gammastrahlung.

Die Westernblot-Analyse für phosphoryliertes BAD zeigt starke Banden bei allen adhärenzten Varianten der Zelllinien H69, N592 und H82. Diese Tatsache bestätigt, dass AKT einen Teil seiner antiapoptotischen Wirkung in den varianten Kleinzellerlinien durch Inhibition von BAD ausübt. Auf PCR-Ebene fällt auf, dass BAD in den adhärenzten Klonen schwächer expremiert ist als in den Suspensionsklonen, so dass möglicherweise BAD nicht nur auf Proteinebene mittels Phosphorylierung durch AKT, sondern auch auf transkriptioneller Ebene reguliert wird. Es fällt auf, dass H82ad ebenfalls ein starkes Maß an BAD-Phosphorylierung zeigt, obgleich für diese Linie keine AKT-Aktivität im Western-Blot nachgewiesen werden konnte.

Hier muss ein alternativer Weg der BAD-Inhibition angenommen werden, der möglicherweise über den MAPK-Signalweg vermittelt wird [Scheid et al.]. Da MAPK in den adhärenen Varianten aller untersuchten Kleinzeller stark aktiviert ist, liegt eine Involvierung dieses Signalwegs im Apoptoseschutz via BAD-Phosphorylierung nahe.

Für weitere Mitglieder der BCL2-Familie konnte keine differentielle Genexpression in den SCLC-Linien nachgewiesen werden.

8.4 Adhärenzvermittelter Apoptoseschutz

8.4.1 Integrinexpression in adhärenen Zelllinien

Neben der Aktivierung von AKT durch Wachstumsfaktoren wie PDGF [Burgering und Coffey] besteht ein adhärenzvermittelter Alternativweg. Sethi et al. beschreiben eine $\beta 1$ -Integrin-vermittelte Tyrosinkinaseaktivierung in SCLC-Zellen, die in diesen zu erhöhter Chemoresistenz führt. Dieser Weg wird durch Adhäsion an die extrazelluläre Matrix initiiert.

Aufgrund des beobachteten Adhärenzphänomens und der Chemoresistenz der untersuchten adhärenen Varianten lässt sich die These ableiten, dass Adhärenz und Resistenz sich gegenseitig bedingen. Auf PCR-Ebene findet sich in vielen adhärenen Klonen eine Überexpression der Integrinuntereinheiten $\alpha 2$ und $\alpha 3$. Besonders deutlich sind die Unterschiede zwischen Suspensionszellen und adhärenen Zellen für die Subklone der Linie H69ad und N592. In diesen Zelllinien ist ebenfalls die Proteinkinase B stark aktiviert. Für das $\beta 1$ -Integrin besteht für alle untersuchten Zelllinien eine starke Expression, die jedoch nicht differentiell ausfällt. Da Integrine sich aus zwei Untereinheiten zusammensetzen, ist eine Involvierung der $\beta 1$ -Untereinheit in die AKT-Aktivierung möglich, wie von Sethi et al. Beschrieben, und aufgrund seiner Versuche mit blockierenden Antikörpern gegen das $\beta 1$ -Integrin anzunehmen. Die starke Expression einiger Integrinuntereinheiten in den adhärenen Klonen kann als molekulares Korrelat der morphologischen Differenzierung in einen epithelartigen Phänotyp gedeutet werden, da adhärenente Zellen integrinvermittelt Kontakt zur Extrazellulären Matrix aufnehmen.

8.4.2 Adhärenz und AKT-Aktivierung

Nach der Charakterisierung der varianten Zellen durch ihren adhärenenten Phänotyp, ein hohes Maß an AKT-Aktivität und Integrinexpression stellt sich die Frage einer kausalen Verknüpfung dieser Phänomene.

Aus diesem Grund wurden Experimente zur Aufhebung der Adhärenz durchgeführt und die Auswirkung auf die AKT-Expression untersucht. Die adhärenenten Varianten wurden auf Bakterienkulturschalen überführt und einige Wochen kultiviert. Sämtliche Zellen verloren nach einigen Tagen ihren adhärenenten Phänotyp.

In den routinemäßig verwendeten Gewebekulturflaschen befindet sich eine Beschichtung aus Poly-L-Lysin, welche die Extrazelluläre Matrix simuliert und den Zellen zur Anheftung dient. Diese Beschichtung fehlt den Bakterienkulturflaschen, so dass die Anheftung der Tumorzellen und ihre Kommunikation mit der ECM verhindert wird. Den Stimulus zur AKT-Phosphorylierung erhält die Zelle allerdings nur durch Assoziation ihrer Adhäsionsmoleküle (Integrine) mit der ECM [Sethi et al.]. Wie erwartet ergab die Western-Blot-Analyse der Zellen, die zuvor eine Woche auf den Bakterienschalen kultiviert worden waren, einen starken Rückgang der AKT-Aktivität im Gegensatz zu den vormals adhärenenten varianten Zellen. Ein Zusammenhang zwischen Adhärenz und AKT-Aktivität ist somit für die untersuchten varianten Zellen H69ad und N592ad bewiesen.

Ob dieser Effekt direkt durch Integrine vermittelt wird oder auf eine andere Weise mit der Adhärenz in Zusammenhang steht, bleibt noch zu untersuchen. Zu diesem Zweck sollten Experimente mit integrinblockierenden Antikörpern durchgeführt werden, um in den adhärenenten Zellen einzelne Integrinuntereinheiten blockieren und deren Auswirkung auf die AKT-Aktivierung untersuchen zu können. Von Sethi et al. konnten in adhärenenten SCLC-Zellen durch blockierende Antikörper gegen $\beta 1$ -Integrin sowohl die Adhäsion als auch die AKT-Aktivität in den Zellen aufgehoben werden.

Als weiterer Aspekt bleibt zu untersuchen, ob die erhöhte Resistenz der adhärenenten Zellen nach Aufhebung der AKT-Aktivität ebenfalls reversibel ist. Eine erhöhte Chemoresistenz adhärenenter Kleinzeller ließ sich nach Sethi et al. durch Aufhebung der Adhärenz durch $\beta 1$ -blockierende Antikörper abschwächen. Jedoch ist diese Resistenz nur für spezifische Adhärenz an Fibronectin und nicht für unspezifische an Poly-L-Lysin bestätigt. Diese Aussage ließ sich für die untersuchten Zelllinien H69 und N592 nicht bestätigen.

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Zellen zeigten bei unspezifischer Adhärenz eine erhöhte Resistenz gegenüber Chemotherapie und Bestrahlung.

8.5 MAPK-Aktivität

Die Western-Blot-Analyse ergab in den adhärenenten Klonen der drei untersuchten Zelllinien H69, N592 und H82 ein starkes Ausmaß an MAPK-Phosphorylierung bei hoher MAPK-Gesamtexpression in allen Kleinzellerlinien. Diese Kinase ist wichtig für Differenzierungsvorgänge und die Zellproliferation [Marshall et al., Seger et al.]. Insofern erklärt sich die Überaktivität in den adhärenenten Zellen mit verstärkten Differenzierungsvorgängen beim Übergang von der Suspensionsform in den epitheloiden Phänotyp. Es ist beschrieben, dass bei Inhibition der MAPK in PC12-Zellen die vormals adhärenenten Zellen ihre Morphologie ändern und Aggregate bilden [Qun Lu et al.].

Desweiteren ist ein Einfluss der MAPK auf die Expression von Adhäsionsmolekülen des Cadherin-Catenin-Systems bekannt. Diese Proteine sind essentiell für die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten und werden durch MAPK-Aktivität inhibiert. Auf diese Weise verlieren die Zellen ihre Fähigkeit, in Aggregaten zu wachsen, und werden adhärenent [Qun Lu et al.]. Von mehreren Arbeitsgruppen wird eine Beteiligung der MAPK für die Expression von Integrinen jedoch verneint [Qun Lu et al., Sebolt-Leopold et al.]. Integrine sind insbesondere wichtig für den Kontakt zwischen Zellen mit ihrer Extrazellulären Matrix [Sethi et al.]. Jedoch lässt sich umgekehrt die MAPK-Aktivierung durch Integrine erklären, da hier analog zur AKT-Phosphorylierung via Integrine ein Weg der MAPK-Aktivierung beschrieben ist [Chen et al., Schlaepfer et al., Morino et al., Zhu und Assoian]. Diese Möglichkeit wird von einigen Autoren verneint [Hotchin und Hall].

Abschließend lässt sich feststellen, dass die verstärkte MAPK-Aktivität in den drei adhärenenten Kleinzellerlinien im Zusammenhang mit deren morphologischer Umdifferenzierung steht. Die Adhäsion und Expression von Adhäsionsmolekülen ist ebenfalls durch MAPK bedingt. Die Überexpression einzelner Integrinuntereinheiten jedoch lässt sich damit nicht erklären.

Da die MAPK-Aktivität nicht den Hauptaspekt des Projekts darstellte, wurde auf die Betrachtung des Cadherin-Catenin-Systems weitgehend verzichtet. In einer durchgeführten RT-PCR jedoch fiel eine verminderte E-Cadherin-Expression in einigen adhärenen Varianten im Gegensatz zur Suspensionsform auf. Diese Tatsache deckt sich mit der Annahme von Qun Lu et al., dass MAPK zur Inhibition der E-Cadherinsynthese führt und somit die Zell-Zell-Kontakte in den Zellaggregaten aufgelöst werden. Aus der Unfähigkeit zum Ausbilden von Zellkontakten resultiert nach der genannten Untersuchung die Ausbildung des adhärenen Phänotyps.

In vielen Tumoren ist eine Überexpression oder konstitutive Aktivität der MAPK nachgewiesen worden [Sebolt-Leopold et al., Hoshino et al.]. Sehr hohe Level an MAPK-Aktivität sind neben anderen Tumoren auch für sämtliche Lungentumoren beschrieben [Hoshino et al.]. Dies kann anhand der durchgeführten Versuche für die betrachteten SCLC- und NSCLC-Linien bestätigt werden, wobei betont werden muss, dass die adhärenen Varianten eine noch wesentlich stärkere MAPK-Aktivität zeigen als die Suspensionszellen. Als Konsequenz dieser ständigen Aktivität der Kinase kommt es im Tierexperiment zu ungehinderter Proliferation und Karzinogenese [Whitmarsh et al.]. Konstitutive MAPK-Aktivität gilt als Malignitätskriterium für Tumoren, und die Tatsache der MAPK-Überexpression in den varianten Klonen vervollständigt das Bild von besonders malignen Tumorzellen.

8.6 Klinische Relevanz

Sekundäre Resistenz beim kleinzelligen Bronchialkarzinom ist nach wie vor das Hauptproblem bei der Bekämpfung dieser Tumorart, da die Erkrankung im resistenten Rezidiv sehr rasch einen letalen Verlauf nimmt.

Es ist bekannt, dass die Resistenzentwicklung der SCLC-Tumoren mit der Umdifferenzierung zu varianten Tumorzellen einhergeht, welche ihre typischen SCLC-Eigenschaften verlieren und eine erhöhte Resistenz entwickeln.

Die molekularen Mechanismen, die diese Widerstandsfähigkeit bedingen, sind bislang nur unzureichend erforscht. Für andere Tumorarten relevante Resistenzmechanismen wie die beschriebene Multi-Drug-Resistenz zeigten für das SCLC keine Gültigkeit [Lai et al.; Supino et al.; Savaray et al.].

Auffällig war, dass sich die klassischen SCLC-Zellen unter Kulturbedingungen bevorzugt zu adhären Zellen entwickelten, wenn sie nicht optimal versorgt wurden, z.B. ein Serumwechsel seltener stattfand und die Zellen nicht so häufig geteilt wurden. Zustände wie vermehrte Zelldichte, Nährstoffmangel und verminderte Sauerstoffsättigung mögen sich im Inneren eines schnell wachsenden Tumors ebenso vorfinden. Es ist gut vorstellbar, dass diese Umgebungsbedingungen auch *in vivo* die Variantenentstehung fördern.

Diese Arbeit hat dazu beigetragen, das Phänomen der Variantenentstehung beim kleinzelligen Bronchialkarzinom im Zellkulturmodell zu beobachten. Die Relevanz der Proteinkinase B für die Resistenz von zwei der drei untersuchten Zelllinien wurde identifiziert. Das vorgestellte Modell ist zunächst auf seine Ausweitbarkeit auf weitere SCLC-Zelllinien *in vitro* zu prüfen. Daran sollte sich die Übertragung der Ergebnisse auf *in vivo*-Bedingungen anschließen, was eine Untersuchung des Verhaltens der entstandenen varianten Zellen im Tierversuch im Bezug auf ihre Malignität und Resistenz einschließt. Histochemische Nachweise von aktivierter AKT-Kinase in humanen Lungentumoren, insbesondere in kleinzelligen Rezidivtumoren sollen folgen. Auf diese Weise wäre gegebenenfalls ein durch die Zellkulturbedingungen entstandener Artefakt auszuschließen. Es ist anzumerken, dass sich insbesondere Zellen nach vielen Passagen in Kultur von ihrem ursprünglichen Zelltyp unterscheiden können. Abschließend besteht die Aufgabe, einen Inhibitors der Proteinkinase B oder des entsprechenden Signalwegs zu entwickeln, zu erproben und seine Nutzbarkeit im klinischen Alltag zu testen.

Für den MAPK-Signalweg sind derartige Inhibitoren bereits im Tierexperiment mit Erfolg getestet worden [Sebolt-Leopold et al.]. Kolontumoren in Mäusen gingen unter Einsatz des Inhibitors PD184352 zurück, wobei das Pharmakon auf die Mäuse keinerlei Nebenwirkungen ausübte. Seit längerer Zeit bekannte Inhibitoren des AKT-Signalwegs sind Wortmannin und LY294002 [Hemmings et al., Kauffmann-Zeh. Ozes et al.]. Sie hemmen die PI3-Kinase und somit auch AKT im Signalweg abhängig von PI3K.

Diese Inhibitoren sind bislang nur im Zellkulturexperiment beschrieben und deshalb nur fraglich *in vivo* einsetzbar. Dennoch liegt in der Beschreibung von Signalwegen, die für die Tumorgenese von Relevanz sind, und in der Entwicklung spezifischer Inhibitoren, die in eben diese Signalwege eingreifen, eine spezifische und erfolgversprechende Therapieoption von Tumorleiden.

9. Zusammenfassung

Die sekundäre Therapieresistenz bei kleinzelligen Bronchialkarzinomen ist ein bislang unerklärtes und unbeherrschtes Problem. Dabei korreliert die aufkommende Resistenz nach vorangegangener Therapie mit dem Nachweis varianter Zellen im Sektionsgut, die ihre typischen SCLC-Marker verloren haben. Die Entstehung von varianten SCLC-Zellen konnte im Rahmen der Vorarbeiten zu den beschriebenen Experimenten unter Kulturbedingungen beobachtet werden.

In dieser Arbeit werden die im Zellkulturmodell entstandenen adhärenenten SCLC-Zelllinien charakterisiert und auf die Aktivität von Signalwegen untersucht, die im Zusammenhang mit verstärktem Resistenzverhalten gegenüber Chemotherapie und Gammastrahlen stehen. Den Schwerpunkt der Experimente bildet die Proteinkinase B (AKT), welche für die Aktivierung antiapoptotischer Signalwege bekannt ist.

Die varianten Zellen weisen im Gegensatz zu den klassischen SCLC-Zellen *in vitro* einen adhärenenten Phänotyp auf. Klassische SCLC-Zellen wachsen typischerweise in schwimmenden Aggregaten. Auffällig ist ein Verlust der für klassische Kleinzeller typischen neuroendokrinen Marker L-Dopa-Decarboxylase, Chromogranin A und NSE in den adhärenenten Klonen. Außerdem besteht erhöhte Chemo- und Radioresistenz im Vergleich zu den entsprechenden klassischen SCLC-Zellen. Diese Eigenschaften entsprechen den bekannten Charakteristika varianter Kleinzeller.

Die Transdifferenzierung der Zellen ließ sich bevorzugt unter nicht optimalen Zellkulturbedingungen beobachten, wie beispielsweise bei hoher Zelldichte oder Nährstoffmangel. Vergleichbare Bedingungen sind denkbar in extrem schnell proliferierenden oder in nekrotisch zerfallenden Tumoren nach vorangegangener Chemotherapie, so dass die Variantenentstehung *in vivo* auch durch die Umgebungsbedingungen getriggert werden kann.

Wie in der Arbeit gezeigt werden konnte, ist die Aktivität der Proteinkinase B (AKT) stark erhöht in den adhärenenten Subklonen der klassischen Kleinzellerlinien NCI-H69 und -N592 bei insgesamt hohem Gesamtgehalt an AKT-Protein in sämtlichen Zelltypen. Aufgrund des genannten Zusammenhangs zwischen Chemoresistenzverhalten, verstärkter AKT-Aktivität und antiapoptotischer Wirkung, wurden bekannte AKT-abhängige Signalwege untersucht.

In der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die adhärenenten Klone der untersuchten Kleinzeller einen hohen Grad an BAD-Phosphorylierung aufweisen. Das proapoptotische Protein BAD wird von AKT durch Phosphorylierung inhibiert, so dass die antiapoptotische Wirkung anderer Mitglieder der BCL2-Familie überwiegt, und die Zelle überlebt. Außerdem findet sich eine schwächere BAD-Genexpression in den adhärenenten Klonen, was auf eine zusätzliche transkriptionelle Steuerung von BAD hindeutet.

Der von AKT aktivierte Transkriptionsfaktor NF κ B stellt einen weiteren Gegenstand der Untersuchungen dar. Starke NF κ B-Genexpression ist in sämtlichen Klonen festzustellen. Da NF κ B auf Proteinebene durch Bindung an seinen Inhibitor I κ B reguliert wird, waren Expressionsunterschiede auf Genebene nicht zu erwarten. Der Bandshift-Assay gegen NF κ B ergibt im adhärenenten Klon einer Zelllinie verstärkten NF κ B-Aktivität als Transkriptionsfaktor, was mit der starken AKT-Aktivität in diesem Klon korreliert.

In den adhärenenten Klonen der untersuchten SCLC zeigte sich eine hohe Expression einiger Integrinuntereinheiten auf der Ebene der Genexpression. Aus dieser Tatsache lässt sich ableiten, dass die AKT-Aktivierung in den adhärenenten Klonen im Zusammenhang steht mit ihrem adhärenenten Phänotyp, bzw. über ihren Kontakt mit der ECM vermittelt wird. Unter Kulturbedingungen in unbeschichteten Bakterienkulturschalen verlieren die varianten Zellen ihren adhärenenten Phänotyp und ihre hohe AKT-Aktivität. Dieses Experiment legt die Kausalität von Adhärenz und AKT-Expression nahe. Eine Auswirkung der aufgehobenen Adhärenz und AKT-Aktivität auf die Resistenz der Zellen bleibt noch zu untersuchen.

Neben erhöhter AKT-Aktivität fallen die adhärenenten SCLC-Klone durch ihre hohe MAPK-Aktivität auf, die den Suspensionszellen fehlt. Da MAPK in der Zelle an Proliferation und Differenzierungsvorgängen beteiligt ist, wird die Aktivität der Kinase mit der morphologischen Veränderung der Zellen korreliert.

Die beschriebenen Experimente deuten stark auf eine Relevanz von AKT für das Resistenzverhalten von varianten SCLC-Zellen hin. Die an drei Zelllinien getroffenen Beobachtungen sind auszuweiten auf weitere SCLC-Zelllinien und auf ihre *in vivo*-Übertragbarkeit zu prüfen. Bei Bestätigung der Vermutungen ergeben sich zukünftige Therapieoptionen in der Entwicklung von Inhibitoren des AKT-Signalwegs, welche *in vitro* bereits erfolgreich eingesetzt werden.

10. Literaturverzeichnis

- Abe Y et al.** British Journal of Cancer;12/96;74(12):1929-34
P-glycoprotein-mediated acquired multidrug resistance of human lung cancer cells in vivo
- Ahmed et al.** Proc.Natl.Acad.Sci.USA 94,3627-3632;97
Transduction of interleukin-2 antiapoptotic and proliferative signals via AKT protein kinase.
- Alessi et al.** EMBO Journal. Vol 15. 65441-6551;96
Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1
- Altieri et al.** Lab invest. 99 Nov; 79 (11):1327-33
Survivin apoptosis: an interloper between cell death and cell proliferation in cancer
- Andjelkovic et al.** Proc Acad. Sci. U.S.A. 93,5699,(96)
- Ambrosini et al.** Nature Medicine 97 Aug 3(8) 917-21
A novel anti-apoptotic gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma
- Baenkler, Klingmüller et al.**
Duale Reihe Innere Medizin, Hippokrates Verlag Stuttgart
- Baldwin** Nature Medicine 3/97; 378-380
Multidrug resistance- a multiplex phenomenon
- Ballett et al.** Cancer Research. 56: 4255-4263; 96
Inhibition of neuropeptide-stimulated tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity stimulates apoptosis in small cell lung cancer cells.
- Baylin et al.** Cancer Research. 40:1990-94;80
Activities of L-dopa decarboxylase and diamine oxidase (histaminase) in human lung cancer and decarboxylase as a marker for small (oat) cell cancer in cell culture
- Bellacosa et al.** International Journal of Cancer 64: 280-285;95
Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas
- Bellacosa et al.** Science,254,274-277; 1991
A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region
- Bondeva et al.** Science Vol 282, Oct.98
Bifurcation of Lipid and Protein Kinase Signals of PI3K? to the Protein Kinases PKB and MAPK

Boulton et al. Cell 65,663-675; 91

Brunet et al. Cell 96, 857-868; 99

Akt promotes cell survival by phosphorylation and inhibiting a Forkhead transcription factor.

Burgering, Coffe et al. Nature 376, 599,(95)

Protein kinase B(c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction

Burgering et al. Molecular Cell Biology 13, 7248-7256; 93

Epidermal growth factor induces phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 2 via multiple pathways

Carbone Seminars in Oncology, Vol 24, No 4, 97, pp 388-401

The Biology of Lung Cancer

Cardone et al. Science Vol 282, pp 1318-1321; Nov.98

Regulation of Cell Death Protease Caspase-9 by Phosphorylation

Carney et al. Cancer Research 45:2913-2923;85

Establishment and identification of small cell lung cancer lines having classic and variant features.

Carney et al. Cancer Research 43:2806-2811; 83

In vitro radiation and chemotherapy sensitivity of established cell lines of human small cell lung cancer and its large cell morphological variants

Chen et al. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.91,10148-10152; 94

Association of focal adhesion kinase with its potential substrate phosphatidylinositol 3-kinase.

Chen et al. Journal of Biological Chemistry.269,26602-26605;94

Integrin-mediated cell adhesion activates mitogen-activated protein kinases.

Chen et al. Molecular Cell Biology 12, 915-927; 92

Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases

Cheng et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA,93: 3636-3641; 96

Amplification of AKT2 in human pancreatic cancer cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA

Coffe et al. European Journal of Biochemistry, 201,475-481;91

Molecular cloning and characterisation of a novel protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families.

- Cohen et al.** Trends in Biochemical Science 17, 409-413; 92
Signal integration at the level of protein kinases, protein phosphatases and their substrates
- Cooper et al.** Molecular Cell Biology 4, 30-37; 84
Diverse mitogenic agents induce the phosphorylation of two related 42,000-dalton proteins on tyrosine in quiescent chick cells
- Cowley et al.** Cell 77, 841-852; 94
Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH3T3 cells.
- Cross, Darren et al.** Nature Vol 378 Dec 95
Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B
- Darren, Cross et al.** Nature Vol 378 Dec 95
Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B
- Datta et al.** Cell Vol91 ,231-241, Oct 97
Akt Phosphorylation of BAD Couples Survival Signals to the Cell-Intrinsic Death Machinery
- Dimmeler et al.** Nature 399, 601-605; 99
Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation
- Dimmeler et al.** Journal of Experimental Medicine 185, 601-607; 97
Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1 beta-converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-like proteases
- Dudek et al.** Science 275,661-665;97
Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt.
- Eliceiri et al.** Cellular Biology. 140,1255-1263; 98
Integrin alphavbeta3 requirement for sustained mitogen-activated protein kinase activity during angiogenesis
- Franke et al.** Cell 81, 727 (95)
The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase.
- Franke et al.** Cell 88, 435-437, Feb 21;1997
PI3K: Downstream AKTion blocks Apoptosis
- Frisch et al.** Cellular Biology 124 :619-626(1994)
Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis

- Fushimi H et al.** Cancer 96 Jan 15;77(2):278-83
Histologic changes in small cell lung carcinoma after treatment
- Gassen, Schrimpf et al.** Gentechnische Methoden, Spektrum Verlag
- Gazdar et al.** Cancer Research 45;2924-2930; Jun 85
Characterization of Variant Subclasses of Cell Lines Derived from Small Cell Lung Cancer Having Distinctive Biochemical, Morphological, and Growth Properties.
- Gazdar et al.** Small Cell Lung Cancer 1981; pp145-175
Small cell carcinoma of the lung: cellular origin and relationship to other pulmonary tumors.
- Giancotti et al.** Science 99 Aug 13; 285 (5430): 1028-32
Integrin signaling
- Goodman GE et al.** Curr Probl Cancer 98;Jan-Feb;13(1):1-54
Small cell lung cancer
- Goodwin et al.** Cancer Research 42:1361-67; 82
Relationship between neuroendocrine differentiation and sensitivity to radiation in culture line OH-1 of human small cell lung carcinoma
- Graves et al.** Nature 403,328-332; 2000
Regulation of carbamoyl phosphite synthetase by MAP kinase
- Hemmings** Science Vol 275 31st Jan. 97
AKT Signaling : Linking Membrane Events to Life and Death Decisions
- Herold und Mitarbeiter**
Innere Medizin, 2002
- Herrera et al.** J. Cell. Science 111,1039-1049; 98
Modulation of hepatocyte growth factor-induced scattering of HT29 colon carcinoma cells.
- Hinz et al.** Molecular Cell Biology 19,2690-2698, 99
NF κ B function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition
- Hirsch et al.** Cancer; 83 Dec 1;52(11):2144-50
The prognostic significance of histopathologic subtyping of small cell carcinoma of the lung according to the classification of the World Health Organization. A study of 375 consecutive patients

- Hoshino et al.** Oncogene 18, 813-822; 99
Constitutive activation of the 41-/43kDA mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors.
- Howe et al.** Cell 71,335-342; 92
Activation of the MAP kinase pathway by the protein kinase raf.
- Hunter et al.** Cell 80, 225-236; 95
Protein kinases and phosphatases : the yin and yang of protein phosphorylation and signaling
- Kane et al.** Current Biology 9, 601-604; 99
Induction of Nf-kappaB by the Akt/PKB kinase
- Karin et al.** proc. Natl. Acad. Sci. USA 95,9067-9069; 98
JNK or IKK, AP-1 or NFkB, which are the targets for MEK kinase 1 action?
- Kasimis BS et al.** American Journal of Clinical Oncology 86 Aug ;9(4):318-24
Relationship between changes in the histologic subtype of small cell carcinoma of the lung and the response to chemotherapy.
- Kauffmann-Zeh et al.** Nature 385,544-548;97
Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signaling through PI(3)K and PKB.
- Kelly et al.** Nature 390: 632-636; 97;
Cdc42 and Rac1 induce integrin-mediated cell motility and invasiveness through PI(3)K.)
- Khwaja** Nature Vol 40, Sept.99, 33-34
Akt is more than just a Bad kinase Review
- Klemke et al.** Journal of Cellular Biology.137,481-492; 97
Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase.
- Klippel et al.** Molecular Cell Biology 17,338-344,97
A specific product of phosphatidylinositol 3-kinase directly activates the protein kinase Akt through ist pleckstrin homology domain.
- Kodaki et al.** Current Biology 4,798-806; 94
The activation of phosphatidylinositol 3-kinase by Ras.
- Kohn et al.** EMBO Journal.14, 4288 (95)
Insulin stimulates the kinase activity of RAC-PK, a pleckstrin homology domain containing ser/thr kinase.

- Kohn et al.** Journal of Bio. Chem. 271,21920-21926; 96
Akt, a pleckstrin-homology domain containing kinase, is activated primarily by phosphorylation.
- Krajewski** Cancer Research 93; 53: 4701-4714
Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: Residence in the nuclear envelope, endoplasmatic reticulum, and outer mitochondrial membranes.
- Kulik et al.** Molecular Cell Biology 17,1595-1606; 97
Antiapoptotic signaling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase and Akt.
- Kwaja et al.** EMBO Journal. Vol.16 No.10 pp.2783-2793; 97
Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway
- Lai et al.** J.Natl.Cancer Inst.81,1144-1150;89
MDR1 gene expression in lung cancer
- Lewin** Molekularbiologie der Gene, Spektrum Verlag
- Little et al.** Nature 306: 194-96; 83
Amplification of the c-myc oncogene in human lung cancer cell lines.
- Mansour et al.** Science 265,966-970, 94
Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase
- Marangos et al.** Cancer Lett. 15: 67-71; 82
Neuron specific enolase in human small cell carcinoma cultures
- Marshall** Cell 80,179-185; Jan 95, Review
Specificity of Receptor Tyrosine Kinase Signaling: Transient versus Sustained Extracellular Signal-Regulated Kinase Activation
- Mayo et al.** Science 278, 1812-1815; 97
Requirement of NFkB activation to suppress p53-independent apoptosis induced by oncogenic Ras.
- Mercurio et al.** Curr. Opin. Cell. Biol. 11,226-232; 99
Multiple signals converging on NFkappaB
- Moody et al.** Science 214: 1246-1248; 81
High levels of Bombesin characterize human small-cell carcinoma.

- Moore et al.** Cancer Research 58,5239-5247; Nov 15; 98
The Presence of a Constitutively Active Phosphoinositide 3-Kinase in Small Cell Lung Cancer Cells Mediates Anchorage-independent Proliferation via a Protein Kinase B and p70s6k- dependent Pathway
- Muslin et al.** Cell 84, 889-897; 96
Interaction of 14-3-3- with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine.
- Nagata et al.** Cell 1997;88:355-365
Apoptosis by death factors
- Ozes et al.** Nature 401, 82-85; 99
NF- κ B activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase
- Pawson** Nature 373, 573-580; 95
Protein modules and signalling networks
- Qun Lu et al.** Mol. and Cell. Biol. Jun 98; pp. 3257-3265
Basal extracellular Signal-Regulated Kinase Activity Modulates Cell-Cell and Cell-Matrix Interactions
- Radice PA et al.** Cancer; 82 Dec 15;50(12):2894-902
The clinical behavior of mixedsmall cell/large cell bronchogenic carcinoma compared to pure small cell subtypes
- Ray and Sturgill** Proc.Natl.Acad.Sci. USA 84,1502-1506; 87
Rapid stimulation by insulin of a serine/threonine kinase in 3T3-L1 adipocytes that phosphorylates microtubule-associated protein 2 in vitro
- Rodriguez-Viviana et al.** Nature 370,527-532; 94
Phosphatidylinositol 3-OH kinase as a direct target of Ras.
- Romashkova et al.** Nature 401, 86-90; 99
NF- κ B is a target of Akt in anti-apoptotic PDGF signaling
- Sato et al.** Cancer 2001 Jul 15; 92(2) : 271-8
Expression of survivin is correlated with cancer cell apoptosis and is involved in the development of human pancreatic duct cell tumors
- Savaraj N et al.** American Journal of Clinical Oncology 97 Aug; 20(4):398-430
Multidrug -resistant gene expression in small-cell lung cancer
- Scheid et al.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 95,7439-7444, Jun 98
Dissociation of cytokine-induced phosphorylation of Bad and activation of PKB/akt: Involvement of MEK upstream of Bad phosphorylation

- Sebolt-Leopold et al.** Nature Medicine 5, 7, 810-816; Jul. 99
Blockade of the MAP kinase pathway suppresses growth of colon tumors in vivo
- Seger et al.** J.Biol. Chem. 269:25699-25709; 94
Overexpression of mitogen-activated protein kinase kinase (MAPKK) and its mutants in NIH 3T3 cells
- Sethi et al.** Nature Medicine 99 Jun;5.6:662-668
Extracellular matrix proteins protect small cell lung cancer cells against apoptosis: A mechanism for small cell lung cancer growth and drug resistance in vivo
- Shaw, Rabinowitz et al.** Cell 91: 949-960; 97
Activation of phosphoinositide 3-OH kinase by the $\alpha 6 \beta 4$ integrin promotes carcinoma invasion .
- Shtivelman** Oncogene 97;14:2167-2173
A link between metastasis and resistance to apoptosis of variant small cell lung carcinoma
- Sonoda et al.** Journal of Biological Chemistry Vol.274;15 ;10566-10570; 99
FAK Is the Upstream Signal Protein of the Phosphoinositol 3-Kinase-Akt Survival Pathway in Hydrogen Peroxide-induced Apoptosis of a Human Glioblastoma Cell Line
- Sorenson et al.** Cancer 47:1289-96; 81
Hormone production by cultures of small-cell carcinoma of the lung.
- Supino et al.** International Journal Cancer; 93 May 8 ;54(2):309-14
A study of cross resistance pattern and expression of molecular markers of multidrug resistance in a human small-cell lung-cancer cell line selected with doxorubicin
- Thomas C. et al.** Spezielle Pathologie, Schattauer-Verlag
- Van Antwerp et al.** Science 96;274:787-789
Suppression of TNF α induced apoptosis by NF κ B
- Wang et al.** Science 98; 281:1680-1683
NF κ B antiapoptosis:induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation
- Wang, Cun-Yu et al.** Nature Medicine; Vol5 No 4; 4/99;412-417
Control of inducible chemoresistance:Enhanced anti-Tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF κ B
- Wang, Cun-Yu et al.** Science 274;96; 784-787
TNF- and cancer therapy induces apoptosis potentiation by inhibition of NF κ B

Whitmarsh et al. Nature 403: 255-56; Jan 2000

A central control for cell growth

Wie-Xing Zong et al. Genes & Development 13:382-387; 99

The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NFkB that blocks TNFa-induced apoptosis

Wistuba et al. Clinical Cancer Research 2000 Jul;6(7):2604-10

Molecular changes in the bronchial epithelium of patients with small cell lung cancer

Yang et al. Cell 80, 285-291; 95

Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death.

Zha et al. Cell 87, 619-628; 96

Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3- not BCL-XL.

Zhu et al. Molecular Biology of the Cell.6,273-282; 95

Integrin-dependent activation of MAPkinase: a link to shape-dependent cell proliferation.

Aus der Arbeit entstandene eigene Publikationen:

Schuermann, Kraus, Ferber, Bachmann et al.

Oncogene 2002 Dec12;21(57):8683-95

In vitro chemo- and radio-resistance in small cell lung cancer correlates with cell adhesion and constitutive activation of AKT and MAP kinase pathways

Meine akademischen Lehrer waren in Marburg:

Prof. Dr. med. Aumüller, Prof. Dr. med. Kern, Prof. Dr. Lammel, Prof. Dr. med. Weihe,
Prof. Dr. Löffler, Prof. Dr. Dr. Daut, Prof. Dr. Moll, Prof. Dr. Gotzen,
Prof. Dr. Rothmund, PD Dr. Hellinger, Prof. Dr. Arnold,
Prof. Dr. Happle, Prof. Dr. Oertel.

Danksagung:

Den zahlreichen Personen, die auf sehr unterschiedliche Weise am Zustandekommen dieser Arbeit beteiligt waren, möchte ich an dieser Stelle danken.

Zunächst danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Marcus Schuermann für die Unterstützung bei der Themenfindung und der fachlichen Betreuung während der Experimente und beim Verfassen der Arbeit.

Eine besondere Anerkennung gilt der gesamten Arbeitsgruppe Schuermann für die sehr persönliche und kollegiale Arbeitsatmosphäre. Insbesondere möchte ich Alison Kraus danken für ihre fachliche wie persönliche Leitung durch die gesamte Promotionszeit.

Sven Oliver Bachmann möchte ich danken für die Bereitstellung seiner Arbeitsergebnisse zu den Chemo- und Bestrahlungsexperimenten und für die gute Zusammenarbeit während des Projektes.

Vielen Dank der Arbeitsgruppe Suske des IMT-Marburg für die Mithilfe bei den Bandshift- Experimenten.

Zum Schluß gilt ein besonders herzliches Dankeschön Michael Poschmann, der durch seine kritischen Nachfragen und oftmals originellen fachfremden Vorschläge beim Korrekturlesen zu neuen Inspirationen verhalf und mich im Kampf mit Text- und Bildbearbeitung nach Kräften unterstützt hat.